



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Detección y cuantificación de la expresión
transcripcional para tres receptores tipo toll y dos
citoquinas proinflamatorias en cultivos de macrófagos
murinos infectados con *Leishmania braziliensis* nativa**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Dina TORRES GONZALES

ASESOR

Libertad ALZAMORA GONZALES

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Torres, D. (2019). *Detección y cuantificación de la expresión transcripcional para tres receptores tipo toll y dos citoquinas proinflamatorias en cultivos de macrófagos murinos infectados con Leishmania braziliensis nativa*. Tesis para optar el grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Nombre: DINA TORRES GONZALES

Código Orcid del autor (dato opcional): <https://orcid.org/0000-0003-2142-7575>

Código Orcid de asesores (dato obligatorio)

Mg. Patricia Woll Toso: <https://orcid.org/0000-0002-1942-0844>

Dr. Enoc Efer Jara Peña: <https://orcid.org/0000-0002-3264-3145>

Mg. Erasmo H. Colona Vallejos: <https://orcid.org/0000-0001-9759-288X>

Dra. Libertad Alzamora Gonzales: <https://orcid.org/0000-0002-7425-7453>

DNI del autor:

10240759

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

financiada por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM, mediante los proyectos: Multidisciplinario 2009 (Cod. PEM2009B01) y CON CON 2010 (Cod. 101001011).

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidad y coordenadas geográficas.

En Lab. De Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas- UNMSM, Lima-Perú.

Año o rango de años que la investigación abarcó:

Se investigó entre los años 2010 -2012



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 179-UPG-FCB-2019

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 18:05 horas del día 01.10.2019 en el Salón de Grados de la
Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Mg. Patricia Gloria Woll Toso	e integrado por
Dr. Enoc Efer Jara Peña	(Miembro)
Mg. Erasmo Honorio Colona Vallejos	(Miembro)
Dra. Libertad Alzamora Gonzales	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **DINA TORRES GONZALES**.

Después de darse lectura al Expediente N° 179-UPG-FCB-19, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL PARA TRES RECEPTORES TIPO TOLL Y DOS CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN CULTIVOS DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS CON *Leishmania braziliensis* NATIVA", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Muy Bueno con la nota de 18

A continuación la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular a la señorita Bachiller **DINA TORRES GONZALES**.

Siendo las 19:25 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, al 01 día del mes de octubre del año 2019.

Mg. Patricia G. Woll Toso
Profesora Principal a T. C.
PRESIDENTE
DINA N° 63775

Dra. Libertad Alzamora Gonzales
Profesora Principal a D. E.
ASESORA
RENACYT N° 14242

Dr. Enoc Efer Jara Peña
Profesor Asociado a D. E.
MIEMBRO
RENACYT N° 18508

Mg. Erasmo H. Colona Vallejos
Profesor Asociado a D. E.
MIEMBRO
RENACYT N° 13690

DEDICATORIA

Quiero dedicar la tesis a mi madre, a quien admiro por su dedicación y fortaleza,
por su constante cooperación y apoyo incondicional.

A mi padre, quien siempre está guiándome desde donde esté.

A toda mi familia, mis hermanos y en especial a mi querida hermana Susana,
gracias por tus consejos.

A Carlos, quien ha sido y es mi constante apoyo en mis esfuerzos de superación
profesional.

A mis hijos, Emily y Daniel, que son mi motivación e inspiración para superarme
y ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco al Señor, por enseñarme el camino correcto de la vida, guiándome y fortaleciéndome cada día, por permitirme conseguir una vez más este logro.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi asesora, la Dra. Libertad Alzamora por haberme formado, desde la base, dentro del mundo de la investigación, por sus buenos consejos y por confiar en mí profesionalmente para el desarrollo y culminación de este proyecto.

A Carlos Padilla quiero dar mi más sincero agradecimiento por su gran colaboración y constante apoyo y dirección para llevar a cabo la realización de la tesis.

Agradezco en forma muy especial a mis dos grandes amigas que me brindan su amor, sus consejos y me motivan cada día a ser mejor: mi madre y mi hermana.

Quiero expresar mi especial gratitud a Carlos Vilca, mi esposo, mi ayuda idónea, por su constante apoyo, por su amor, paciencia, comprensión y motivación, sin lo cual hubiese sido más difícil lograr terminar estos estudios.

Darle las gracias a todos mis amigos y compañeros que me han apoyado en uno u otro momento en el laboratorio de Inmunología: Erasmo, Evelyn, Ana, Marco, Liliana, Joel y Henry.

“Las ideas son como las estrellas, no llegarás a tocarlas con las manos, pero como el marinero en el desierto de las aguas, las eliges como guía y si las sigues alcanzarás tu destino”.

Carl Schurz

La presente investigación ha sido financiada por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM, mediante los proyectos:

Multidisciplinario 2009

(Cod. PEM2009B01) y CON CON 2010 (Cod. 101001011).

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	i-ii
LISTA DE FIGURAS	iii-vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii-xi
RESUMEN	xii-xiii
ABSTRACT	xiv-xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Clasificación taxonómica y filogenia de <i>Leishmania</i>	4
2.2. Epidemiología de <i>Leishmania</i>	5
2.3. Vector trasmisor de leishmaniasis	8
2.4. Morfología y ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	9
2.5. Respuesta inmune inducida por la infección con <i>Leishmania</i>	12
Respuesta innata y respuesta adaptativa	12
Respuesta Celular	14
Interleuquina 12 y <i>Leishmania</i>	14
TNF alfa y <i>Leishmania</i>	16
Receptores tipo Toll y <i>Leishmania</i>	18
2.6. Técnicas para la detectar la expresión de genes	22
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	24

4.1. Caracterización de la cepa C234 de <i>Leishmania</i> mediante secuenciamiento de DNA	24
4.1.1. Cultivo de <i>Leishmania</i>	24
4.1.2. Extracción de DNA de <i>Leishmania</i>	25
4.1.3. Cuantificación de DNA extraído	26
4.1.4. <i>Primers</i>	27
4.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa directa para amplificar minicírculos de kDNA de <i>Leishmania braziliensis</i>	28
4.1.6. Electroforesis del producto amplificado	29
4.1.7. Purificación del producto amplificado	29
4.1.8. Secuenciamiento Genético	30
4.1.9. Análisis molecular de las secuencias	30
4.2. Evaluación de las características morfológicas de macrófagos infectados por <i>Leishmania braziliensis</i>	31
4.2.1. Obtención de macrófagos murinos	31
4.2.2. Infección de macrófagos murinos con <i>Leishmania braziliensis</i>	32
4.3. Cuantificación de los niveles de óxido nítrico producidos por macrófagos murinos infectados con <i>Leishmania braziliensis</i>	33
4.4. Cuantificación de los niveles de expresión transcripcional de los genes TLR3, TLR4 Y TLR9 en macrófagos peritoneales infectados con <i>Leishmania braziliensis</i>	34
4.4.1. Extracción de RNA	34
4.4.2. Retrotranscripción a DNA complementario (cDNA)	35
4.4.3. Selección de <i>Pr5mers</i> para TLR-3, TLR-4 y TLR-9	35
4.4.4. Amplificación de cDNA de los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 mediante qRT-PCR	37

4.5. Cuantificación de los niveles de expresión transcripcional de las citoquinas IL-12 y TNF- α en macrófagos peritoneales murinos infectados con <i>Leishmania braziliensis</i>	39
4.5.1. Selección de primers para IL-12 y TNF- α	39
4.5.2. Amplificación de cDNA de las citoquinas IL-12 y TNF- α en tiempo real	40
4.6. Análisis estadísticos	41
V. RESULTADOS	42
5.1. Análisis genético de las secuencias obtenidas de la cepa C234 de <i>Leishmania braziliensis</i>	42
5.2. Evaluación morfológica de macrófagos murinos infectados con la cepa C234 de <i>Leishmania braziliensis</i>	47
5.3. Detección y cuantificación de óxido nítrico en cultivos de macrófagos peritoneales murinos infectados con <i>Leishmania braziliensis</i>	50
5.4. Cuantificación de la expresión transcripcional de los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 en macrófagos peritoneales murinos infectados con <i>Leishmania braziliensis</i>	52

5.5. Cuantificación de expresión transcripcional de las citoquinas IL-12 y TNF- α en macrófagos peritoneales murinos infectados con <i>Leishmania braziliensis</i>	54
VI. DISCUSIÓN	56
VII. CONCLUSIONES	68
VIII. RECOMENDACIONES	69
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
X. ANEXOS	84

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Filogenia del género *Leishmania*.
(González, 2004).
- Tabla 2.** Distribución de casos de leishmaniasis por grupos de edad y género hasta la semana 2 del 2018.
(Centro Nacional de Epidemiología, prevención y control de enfermedades-MINSA, 2018).
- Tabla 3.** Vectores y potenciales vectores de leishmaniasis en el Perú.
(Zorrilla *et al.*, 2017).
- Tabla 4.** Secuencia de los *primers* empleados para la identificación de *Leishmania*.
(Marcussi *et al.*, 2008)
- Tabla 5.** Lista de *primers* utilizados para la expresión de receptores tipo *Toll* mediante qRT-PCR.
- Tabla 6.** Secuencias de genes utilizados para la expresión de dos citoquinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α y el gen de referencia GAPDH.
- Tabla 7.** Secuencia nucleotídicas de *Leishmania* reportadas en el *genBank* utilizadas para el análisis filogenético.
- Tabla 8.** Capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis* en macrófagos murinos.

Tabla 9. Cuantificación de los niveles de óxido nítrico en cultivo de Macrófagos murinos no infectados e infectados con *Leishmania braziliensis*.

Tabla 10. Análisis comparativo de expresión de mRNA de TLRs y de citoquinas IL-12 y TNF- α y óxido nítrico en cultivo de macrófagos murinos no infectados e infectados con *Leishmania braziliensis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de zonas endémicas a nivel mundial de leishmaniasis cutánea.
(Organización Mundial de la Salud: 2018).
- Figura 2.** Casos reportados de leishmaniasis mucocutánea y cutánea en el Perú.
(Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. Hasta la semana 14 – 2018).
- Figura 3.** Distribución de la leishmaniasis por departamentos en el Perú. A: Desde la semana 1 hasta la semana 52 del año 2017, B: de la semana 1 hasta la semana 2 del 2018.
(Centro Nacional de Epidemiología, prevención y control de enfermedades-MINSA: 2018).
- Figura 4.** Vector transmisor de leishmaniasis. Insecto flebótomo de especie *Lutzomyia longipalpis*.
(Centers for Diseases Control and Prevention CDC: 2017).
- Figura 5.** Estadios de *Leishmania*. A y C: Amastigote y B y D: promastigote.
(<http://fundacionio.org/img/parasitology/img/leishmania6.jpg>)
- Figura 6.** Ciclo de vida de *Leishmania*.
(Centers for Disease Control and Prevention. 2017
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/83/Leishmania_LifeCycle.gif).

- Figura 7.** Comparación de la estructura del receptor de la IL-1 β y los receptores TLR.
(<http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunitetvaccination>).
- Figura 8.** Esquema de la localización de los TLRs en una célula. TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-6 se encuentran en la membrana plasmática y TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9 se encuentran en el citoplasma de la célula dentro de los endosomas.
(Kuzemtseva, 2012).
- Figura 9.** Cultivo de *Leishmania braziliensis* en incubadora de CO₂. El parásito fue cultivado en medio bifásico de agar sangre al 10%.
- Figura 10.** Programa de amplificación del *Primer* LBF1 y LBR1 para *Leishmania*.
- Figura 11.** Ratones Balb/c de 8 semanas en proceso de adaptación.
- Figura 12.** Tratamiento para la obtención de macrófagos peritoneales en ratones Balb/c.
A: Inoculación de Caldo tioglicolato vía intraperitoneal. B: Obtención de macrófagos peritoneales. C: Macrófagos murinos al microscopio, (40X).
- Figura 13.** Preparación de muestra para posterior infección de macrófagos murinos con *Leishmania braziliensis*.
A: Promastigote de *Leishmania braziliensis*. B: Macrófago murino. C: Cultivo por triplicado en microtubos al 5% de CO₂.

- Figura 14.** Análisis de la secuencia del *primer* del gen TLR-9 a través del *Software Primer-Blast*. La secuencia analizada es específica para TLR-9 de *Mus musculus*.
- Figura 15.** Expresión de mRNA transcripcional de los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 en macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* mediante qRT-PCR.
- Figura 16.** Expresión mRNA del gen TNF- α en macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis*. Amplificación por qRT-PCR.
- Figura 17.** Resultado de los alineamientos de los *primers* para LBF1 mediante el algoritmo BLASTN usando patrones de secuencias de nucleótidos del *GenBank*. Se muestra alta homología para el género *Leishmania*. Se utilizó la herramienta bioinformática NCBI.
URL: www.blast.ncbi.nlm.nih.gov
- Figura 18.** Productos amplificados de kan de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, *primer* LBF1/LRF1 de 536 pares de bases.
M: Marcador molecular de PCR marca (Sigma) de 1001000pb. Carriles 1,2 y 4: Productos de amplificación.
Carril 3: Control negativo.
- Figura 19.** Electroferogramas obtenidos en el secuenciador automático *Abi Prism* a partir de los productos de PCR para el gen LBF1 de *Leishmania braziliensis*.
- Figura 20.** Resultado de los alineamientos del producto obtenido por secuenciamiento para el *primer* LBF1 con el programa BLAST del *GenBank*.

- Figura 21.** Análisis del producto secuenciado de LBF1 de los promastigotes de *Leishmania* en el programa BLAST del *GenBak* donde se muestra un porcentaje de identidad de 95.9% con *Leishmania braziliensis*.
- Figura 22.** Comparación de la secuencia nucleotídica de la cepa C234 (LEISHC234) con las secuencias reportadas en el *GenBank* para *Leishmania*, analizadas mediante el programa MEGA 5.10.
- Figura 23.** Árbol filogenético de la secuencia obtenida de la cepa C234 (LEISHC234) mediante el método de NeighborJoining, con 1000 repeticiones. Se observa mayor homología con las especies *Leishmania braziliensis* y *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
- Figura 24.** Macrófagos murinos infectados con parásitos de *Leishmania braziliensis*.
A: Vista al microscopio de macrófagos expuestos a *Leishmania* (40X). **B:** Macrófago fagocitando a *Leishmania braziliensis*, (100X). **C:** Macrófago infectado con amastigotes de *Leishmania braziliensis*, formación de vacuola parasitófora, flecha, (100X).
- Figura 25.** Formación de vacuolas parasitóforas en macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* (100X).
A: Parásito de *Leishmania* (promastigote) y macrófago infectado (24hrs); 1: Promastigote, 2: Flagelo libre, 3: kinetoplasto, 4: Núcleo, 5: Macrófago, 6: Núcleo, 7: Vacuola parasitófora (fagolisosoma), 8: Amastigotes. **B:** Macrófago infectado con amastigotes de *Leishmania braziliensis* (48hrs); 1: Vacuolas parasitóforas.

- Figura 26.** Curva estándar con los valores de absorbancia para producción de óxido nítrico.
- Figura 27.** Cuantificación de óxido nítrico en cultivos de macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis*. Se aplicó la prueba t – Student para muestras independientes. $p=0.0005$, $**p=0.015$, $***p=0.004$, y $****p=0.0001$ cuando son comparados con el grupo no infectado.
- Figura 28.** Cuantificación relativa del mRNA de TLR-3, TLR-4 y TLR-9 en cultivo de macrófagos murinos infectados y no infectados con *Leishmania braziliensis* respecto al calibrador. Se aplicó la prueba t – Student para muestras independientes.
 $*p=0.00005$, $**p=0.0004$, $***p=0.00001$, cuando son comparados con el grupo no infectado.
- Figura 29.** Cuantificación de los niveles de mRNA para las citoquinas IL-12 y TNF- α en cultivos de macrófagos murinos infectados y no infectados con *Leishmania braziliensis* respecto al calibrador. Se aplicó la prueba t – Student para muestras independientes.
 $*p=0.0009$ y $**p=0.00003$, cuando son comparados con el grupo no infectado.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	:	Microgramo
µl	:	Microlitro
µM	:	Micromolar
DNA	:	Ácido desoxi-ribonucleico
cDNA	:	Ácido desoxi-ribonucleico complementario
kDNA	:	DNA de kinetoplasto
RNA	:	Ácido ribonucleico
mRNA	:	Ácido ribonucleico mensajero
Balb/c	:	Cepa de ratones albinos
BLAST	:	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
CD4+	:	Inmunofenotipo 4 ("cluster of differentiation")
CD8+	:	Inmunofenotipo 8 ("cluster of differentiation")
CI	:	Capacidad infectiva
CO ₂	:	Dióxido de carbono
CpG	:	Regiones de DNA que tienen pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos.
Ct	:	Ciclo limiar (" <i>cycle threshold</i> ")
DE	:	Desviación estándar
ELISA	:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
TGF-β	:	Factor de crecimiento transformante beta
GADPH	:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
gp63	:	Glicoproteína 63Kda

gp46	:	Glicoproteína 46Kda
LBF1	:	Secuencia iniciadora de <i>Leishmania braziliensis</i>
LBR1	:	Secuencia reversa de <i>Leishmania braziliensis</i>
LEISHC234	:	Secuencia de la cepa C234 de <i>Leishmania braziliensis</i>
LPG	:	Lipofosfoglicano
IgE	:	Inmunoglobulina E
IgG1	:	Inmunoglobulina G subclase 1
IgG2	:	Inmunoglobulina G subclase 2
IgG2a	:	Inmunoglobulina G subclase 2 isotipo a
IgG3	:	Inmunoglobulina G subclase 3
IL-1	:	Interleucina 1
IL-1 α	:	Interleuquina 1 alfa
IL-1 β	:	Interleuquina 1 beta
IL-2	:	Interleucina 2
IL-4	:	Interleucina 4
IL-5	:	Interleucina 5
IL-10	:	Interleucina 10
IL-12	:	Interleuquina 12
IL-12p35	:	Interleucina 12 subunidad 35
IL-12p40	:	Interleucina 12 subunidad 40
IL-13	:	Interleucina 13
IL-32	:	Interleucina 32
INF- γ	:	Interferón gamma

iNOS	:	Óxido nítrico sintasa inducible
Ip.	:	Intraperitoneal
MyD88	:	Proteína de respuesta primaria de diferenciación
mieloide 88		
LC	:	Leishmaniasis cutánea
LMC	:	Leishmaniasis mucocutánea
LV	:	Leishmaniasis visceral
LPG	:	Lipofosfoglicano
NF- κ B	:	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa en células B activadas
NK	:	Células asesinas naturales
OMS	:	Organismo Mundial de la Salud
ON	:	Óxido nítrico
OGE	:	Oficina General de Epidemiología
pb	:	Pares de bases
PAMPs	:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	:	Buffer fosfato salino
qRT-PCR	:	Cuantificación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
sp.	:	Especie
TAE	:	Disolución tampón formada por tris, acetato y EDTA
Tc1	:	Linfocitos T citotóxico 1
Th	:	Linfocitos T helper
Th1	:	Linfocitos T helper 1
Th2	:	Linfocitos T helper 2

TLR-2	:	Receptor tipo Toll 2
TLR-3	:	Receptor tipo Toll 3
TLR-4	:	Receptor tipo Toll 4
TLR-7	:	Receptor tipo Toll 7
TLR-9	:	Receptor tipo Toll 9
TLR-10	:	Receptor tipo Toll 10
TLR-11	:	Receptor tipo Toll 11
TLR-13	:	Receptor tipo Toll 13
TLR-23	:	Receptor tipo Toll 23
TLRs	:	Receptores tipo Toll
TNF- α	:	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF- β	:	Factor de crecimiento transformante beta
VP	:	Vacuola parasitófora

RESUMEN

Leishmania braziliensis es un protozoario causante de la leishmaniasis o uta, enfermedad endémica crónica de baja patogenicidad, alta morbilidad, metaxénica y zoonótica que compromete piel, mucosas y vísceras. Es transmitida por un díptero del género *Lutzomyia*, afecta alrededor de 12 millones de personas alrededor del mundo y a 12 departamentos en el Perú. *Leishmania braziliensis* tiene patrones moleculares de membrana asociadas a patógenos que son reconocidos por los receptores tipo *toll* (TLR) presentes en el hospedero, tanto en la superficie celular como a nivel intracelular. Los TLRs están conformados por una familia de 23 tipos que van a reconocer ligandos presentes en patógenos en común. Cuando se da la unión del ligando con un TLR desencadenará una secuencia de señales activando la expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas promoviendo una inflamación y activando la respuesta adaptativa. El presente trabajo tiene como objetivos caracterizar a la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* mediante secuenciamiento y detectar y cuantificar los niveles de expresión de mRNA de los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 y de las citoquinas IL-12 y TNF- α en macrófagos murinos enfrentados a la cepa C234 de *Leishmania braziliensis*, endémica del Perú. Se infectó macrófagos peritoneales de ratones Balb/c con promastigotes de *Leishmania braziliensis* y se cultivaron por 24 horas, se midió los niveles de óxido nítrico (ON), se extrajo mRNA de los macrófagos y se detectó y cuantificó los niveles de expresión en los genes de TLR-3, TLR-4 y TLR-9, y de las citoquinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α , a través de la técnica de retrotranscripción mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados indicaron que el estudio filogenético de la cepa C234 mostró alta homología (96%) para *Leishmania braziliensis*. Además, los macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* presentaron mayor producción de ON sólo en las primeras horas de infección, descendiendo a las 24 y 48 horas; y se detectó expresión de mRNA para los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 y de las citoquinas IL-12 y TNF- α . Se concluye

que la cepa nativa C234 pertenece a la especie *Leishmania braziliensis* y que la disminución de la producción de ON está relacionada al mayor tiempo de infección y bajos niveles de expresión del gen TLR-4, así mismo, el incremento del nivel de expresión de mRNA de los genes TLR-3 y TLR-9 podrían estar implicados en la activación de la expresión génica de la citoquina IL-12 en macrófagos peritoneales murinos infectados con *Leishmania braziliensis*.

Palabras clave: *Toll like receptor*, IL-12, TNF- α , macrófagos murinos, óxido nítrico, *Leishmania braziliensis*.

ABSTRACT

Leishmania braziliensis is a protozoan that causes leishmaniasis or uta, a chronic endemic disease of low pathogenicity, high morbidity, metaxenic and zoonotic that compromises skin, mucous membranes and viscera. It is transmitted by a dipterous of the genus *Lutzomyia*, affects around 12 million people around the world and 12 departments in Peru. *Leishmania braziliensis* has pathogen associated membrane molecules that are recognized by toll like receptors (TLRs) present in the host, both on the cell surface and intracellularly. The TLRs are made up of a family of 23 types that will recognize ligands present in common pathogens. When the binding of the ligand is given with a TLR, it will trigger a sequence of signals activating the expression of co-stimulatory molecules and cytokines, promoting inflammation and activating the adaptive response. The present work aims to characterize the C234 strain of *Leishmania braziliensis* by sequencing and detect and quantify the mRNA expression levels of the TLR3, TLR-4 and TLR-9 genes and the cytokines IL-12 and TNF- α in murine macrophages facing the C234 strain of *Leishmania braziliensis*, endemic to Peru. The peritoneal macrophages of Balb/c mice were infected with promastigotes of *Leishmania braziliensis* and cultured for 24 hours, the levels of nitric oxide (NO) were measured, mRNA was extracted from the macrophages and the levels of expression in the genes were detected and quantified of TLR-3, TLR-4 and TLR-9, and of the proinflammatory cytokines

IL-12 and TNF- α , through the retrotranscription technique by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results indicated that the phylogenetic study of strain C234 showed high homology (96%) for *Leishmania braziliensis*. In addition, macrophages infected with *Leishmania braziliensis* showed higher NO production only in the first hours of infection, decreasing at 24 and 48 hours; and mRNA expression was detected for the TLR-3, TLR-4 and TLR-9 genes and the cytokines IL-12 and TNF- α . It is concluded that the native strain C234 belongs to the species *Leishmania braziliensis* and that the decrease in NO production is related to the longer time

of infection and low levels of expression of the TLR-4 gene, as well as the increase in the expression level of mRNA of the TLR-3 and TLR-9 genes could be involved in the activation of gene expression of the cytokine IL-12 in murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania braziliensis*.

Key words: Toll like receptor, IL-12, TNF- α , murine macrophages, nitric oxide, *Leishmania braziliensis*.

I. INTRODUCCIÓN

El protozooario parásito perteneciente al género *Leishmania* causa la afección conocida como leishmaniasis o uta que es transmitida por el piquete de un insecto flebótomo del género *Lutzomyia*. Se encuentra distribuido en numerosos países y se considera que cerca de 12 millones de personas a nivel mundial están infectadas (OMS 2018, MINSA, 2017).

En el Perú, la leishmaniasis constituye la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles, afecta a 12 de sus 24 regiones (Cruzado, *et al.*, 2013). Durante el año 2013 la Oficina General de Epidemiología (OGE) reportó una incidencia de 22.7 x 100,000 habitantes disminuyendo a 20.8 x 100,000 habitantes en el 2017 para la forma cutánea (MINSA, 2018). El control de la leishmaniasis consiste en el diagnóstico y el tratamiento con diversos antimoniales pentavalentes, así como el control del transmisor mediante el uso de insecticidas. Respecto a la especificación del agente etiológico en el Perú, Llanos-Cuentas (1992) describió 4 especies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* y *L. mexicana*. Las ciudades mayormente afectadas son Cusco, Ancash, Madre de Dios, Huánuco, Loreto, Apurímac, Junín, Piura, La Libertad, Ayacucho, Ucayali, Amazonas, Cajamarca y San Martín (reportes de MINSA, 2018).

Leishmania braziliensis, causante de la leishmaniasis cutánea, posee moléculas en su superficie que están relacionadas con la infección denominados determinantes invasivos/evasivos, confiriéndoles a estos parásitos establecerse exitosamente en la vacuola parasitófora de los macrófagos. Los macrófagos son un componente vital de la respuesta inmune innata ya que controlan el crecimiento de los parásitos intracelulares a través de la producción de óxido nítrico (ON), se han realizado ensayos con

diferentes especies de *Leishmania* y su efecto en la producción ON en macrófagos murinos (Giudice *et al.*, 2007; Weinkoff *et al.*, 2013 y Torres *et al.*, 2013) registrándose en algunos casos un incremento y en otros una disminución de óxido nítrico. También se da la liberación de citoquinas y del factor de necrosis tumoral (TNF- α) para promover la inflamación y activar la respuesta adaptativa, así mismo, hay reconocimiento de patógenos mediante patrones moleculares a través de receptores presentes en la superficie de la célula, estos son los receptores de tipo *toll* (TLR).

Los receptores TLR, forman una familia de 23 tipos que van a reconocer ligandos para determinados agentes infecciosos. Cuando se une un TLR con un ligando moviliza una secuencia de señales promoviendo inflamación y activación de la respuesta adaptativa a través de la producción de citoquinas y moléculas coestimuladoras.

Cuando el receptor TLR-4 es activado por lipopolisacáridos, se activa la respuesta inflamatoria y las líneas celulares como los macrófagos reducen la expresión de los peroxisomas, se da un incremento de expresión de TLR3 TLR-4 y TLR-9 en macrófagos infectados con *Leishmania major* (Tolouei *et al.*, 2013). Actualmente se conoce que se expresan determinados receptores para cada especie de *Leishmania*, aunque no hay registros de los tipos de receptores que se expresan para una cepa autóctona de *Leishmania braziliensis* como la empleada en el presente trabajo.

El objetivo general fue evaluar y cuantificar los niveles de expresión transcripcional en los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 y de las citoquinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α en macrófagos peritoneales de ratones Balb/c infectados *in vitro* con una cepa endémica peruana de *Leishmania braziliensis*.

II. ANTECEDENTES

El parásito de *Leishmania* fue descubierto en paralelo, aunque independiente el año 1903 por sir William Boog Leishman, un médico investigador de bacterias y por Charles Donovan, quien atendía a pacientes indios de una afección similar a la malaria llamada kala-azar que atacaba al bazo al que más adelante se le llamaría leishmaniasis visceral (LV) (Awasthi *et al.*, 2004). Anteriormente, William Leishman en el año 1900, ya había detectado al parásito causante de la enfermedad en la sangre del aparato digestivo del insecto transmisor. Más adelante sería sir Ronald Ross quien denominaría al parásito *Leishmania* y hoy en día es conocida como *Leishmania donovani*, causante de LV (Carrión, 2006).

Croft y Coombs, (2003) determinaron que la leishmaniasis es causada por protozoos parásitos intracelulares del género *Leishmania* los cuales son transmitidos por un insecto díptero de la familia Psychodidae. La afección de este vector biológico va a estar en función al género y su distribución en el área geográfica. Información de la Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que las leishmaniasis en humanos se encuentra expandido por todo el mundo y la incidencia fue de 14 millones de afectados y hoy en día se encuentra distribuida en zonas tropicales y subtropicales en más de 88 países con cerca de 350 millones de personas afectadas y declarándose cada año 400.000 nuevos casos (Stuart *et al.*, 2008) (Figura 1). Existen registros desde hace miles de años (400 a 900 d.C.) donde *Leishmania* causó niveles altos de mortalidad y morbilidad, se han encontrado representaciones de esta enfermedad como lesiones cutáneas y deformidades en la cara en antiguos enseres de restos pre-Incas del Perú y en Ecuador (González *et al.*, 2004).

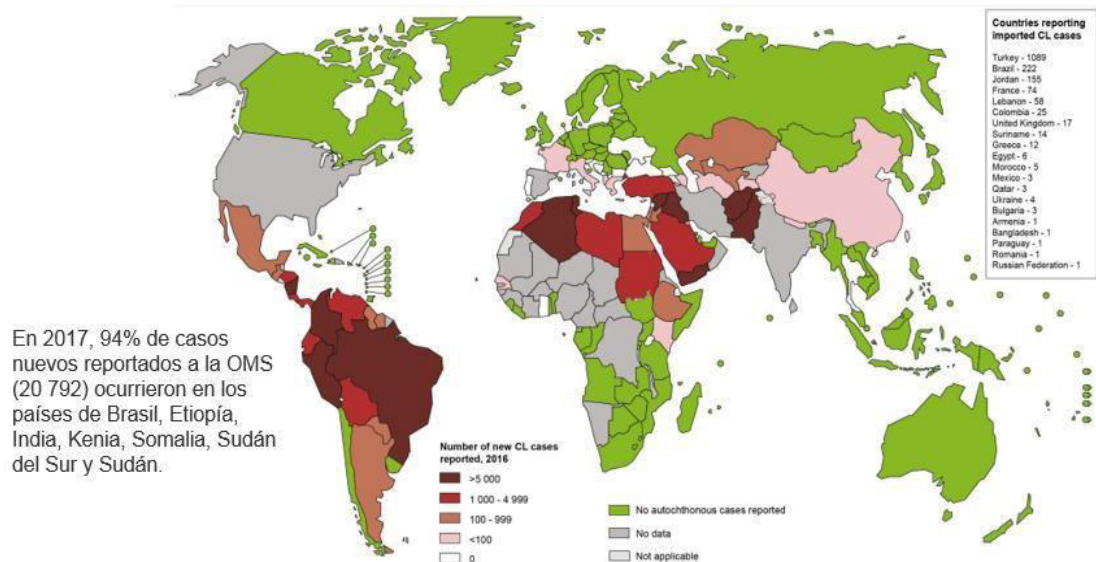


FIGURA 1. Distribución de zonas endémicas a nivel mundial de leishmaniasis cutánea. (Organización Mundial de la Salud, 2018).

2.1 Clasificación taxonómica y filogenia de *Leishmania*

El género *Leishmania* pertenece a la familia Trypanosomatidae. La clasificación basada en la taxonomía considera 2 subgéneros: *Leishmania* y *Vianna*. Se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Filogenia del género *Leishmania*

(González *et al.*, 2004)

Reino:	Protozoa (Goldfuss, 1818)
Subreino	“Biciliata (Cavalier-Smith, 2003)
Phylum	Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)
Clase	Kinetoplastea (Honigberg, 1963)
Subclase	Metakinetoplastina (Moreira, 2004)
Orden	Trypanosomatida (Kent, 1880; Hollande, 1952)
Género	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)
Subgénero	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903), distribuido en el Nuevo y Viejo Mundo
Subgénero	<i>Viannia</i> (Lainson y Shaw, 1987), distribuido en el Nuevo Mundo”.

2.2 Epidemiología de *Leishmania*

Linderberg, Carini y Paranhos en 1990 fueron quienes describieron el primer caso de leishmaniasis en el nuevo continente americano, en pacientes brasileños con lesiones cutáneas demostrando la presencia de amastigotes de *Leishmania*. Fue en Minas Gerais, Brasil, (1911) donde Vianna plantea el nombre de *Leishmania braziliensis* para los agentes causales de lesiones cutáneas (González *et al.*, 2004).

La leishmaniasis es endémica en alrededor de 88 países distribuidos a nivel mundial, no se han reportado casos en el sudeste de Asia. Se estima que 350 millones de personas se encuentran dentro de la población en riesgo. La incidencia de casos a nivel mundial es cerca de 14 millones de infectados y hay más de 2 millones de nuevos reportes por año, siendo alrededor de 500 mil casos relacionados a LV y 1.5 millones a leishmaniasis cutánea, donde el 90% de los reportes proceden de Argelia, Afganistán, Arabia Saudita, Irán, Siria, Perú y Brasil (OMS, 2018). En Sur-América, se da con mayor frecuencia la leishmaniasis mucocutánea (LMC) (90%) en los países de Bolivia, Brasil, y Perú (González *et al.*, 2004).

La leishmaniasis visceral se distribuye en los países de Bangladesh, Sudán, Brasil e India. Cosme-Bueno (1704), relacionó la transmisión de la uta a un vector volador que producía afecciones mucocutánea producidas por *L. braziliensis peruviana*. No existen reportes de casos de leishmaniasis en Chile (Desjeux *et al.*, 1996).

La leishmaniasis en el Perú se reporta en 12 departamentos, la tendencia actual de la leishmaniasis cutánea ha tenido un ligero descenso en los años 2011 y 2015, con ciclos cada 3 o 4 años. La tasa de incidencia acumulada nacional hasta el 2017 es 4,3 por 100 000 habitantes, comparada con 3,1 por 100 000 habitantes en el año 2015 (Figura 2).

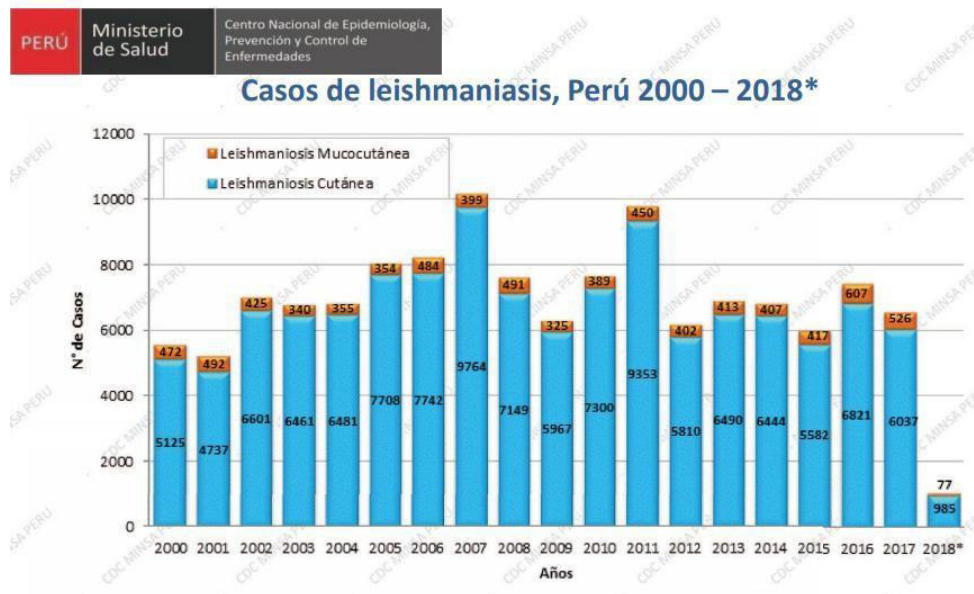


Figura 2. Casos reportados de leishmaniasis mucocutánea y cutánea en el Perú.

(Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades MINSA. Hasta la semana 14 – 2018).

El Centro Nacional de Epidemiología, prevención y control de enfermedades MINSA, reportó al menos 6107 casos de leishmaniasis en el año 2017 en 534 distritos, el 16.4% estaba concentrado con mayor incidencia en tres departamentos Cusco (911), Madre de Dios (635) y San Martín (587). En el año 2018 hasta la semana 2 se registraron 40 infectados por *Leishmania* en 11 departamentos siendo con mayor incidencia Junín (8) y Cerro de Pasco (13) (Figura 3).

El 97.5% de los casos fueron leishmaniasis cutánea y el 2.5% corresponde a leishmaniasis mucocutánea. En cuanto a edades, el mayor porcentaje (32.5%) de casos se reportó en adultos de 30 -59 años y en cuanto a género, el mayor porcentaje (57.5%), se da en hombres (Tabla 2).

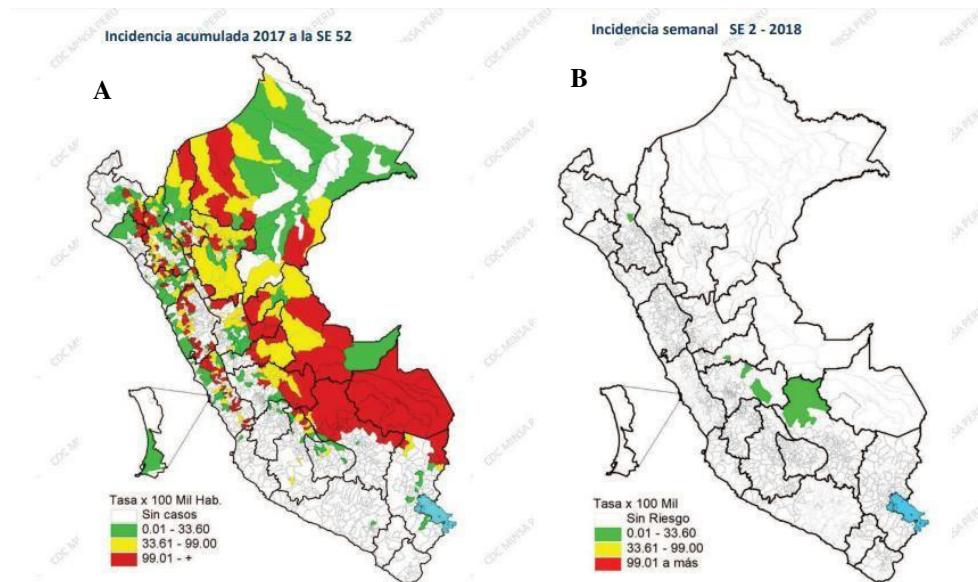


Figura 3. Distribución de la leishmaniasis por departamentos en el Perú.

A: Desde la semana 1 hasta la semana 52 del año 2017. **B:** De la semana 1 hasta la semana 2 del 2018.

(Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades MINSA, 2018).

Tabla 2. Distribución de casos de leishmaniasis por grupos de edad y género.

(Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades MINSA. Datos hasta la semana 2 del 2018).

	N° casos	%	TIA por 100 mil Hab.
Según grupo de edad			
Niños (0 - 11 años)	11	27.5	0.16
Adolescentes (12 - 17 años)	5	12.5	0.14
Joven (18 - 29 años)	8	20.0	0.12
Adulto (30 - 59 años)	13	32.5	0.11
Adulto mayor (60 + años)	3	7.5	0.09
Total	40	100	0.13
Según genero			
Hombres	23	57.5	0.14
Mujeres	17	42.5	0.11

2.3 Vector transmisor de leishmaniasis

La leishmaniasis es transmitida a través de un mosquito flebótomo perteneciente al género *Lutzomyia*, en el nuevo mundo o *Phlebotomus*, en el viejo mundo. Estos vectores son hembras dípteras de la familia Psychodidae. En áreas tropicales los flebótomos poseen un ciclo de vida completo durante todo el año (Figura 4).



Figura 4. Vector transmisor de leishmaniasis. Insecto flebótomo de especie *Lutzomyia longipalpis*.

(Centers for Diseases Control and Prevention. CDC, 2017).

Cáceres y Galati (2001) reportaron 149 especies de flebótomos en el Perú, actualmente se considera que existen más de 190 especies, donde el 80% se localiza en la selva amazónica. Zorrilla, *et al.* (2017) mencionan que existen identificadas cinco especies de mosquitos antropofílicos del género *Lutzomyia* conocido como titira o manta blanca: *L. verrucarum*, *L. peruensis*, *L. noguchii*, *L. ayacuchensis*, y *L. cayennensis*. Su hábitat está distribuido a lo largo de la selva desde las zonas desiertas hasta los lugares más húmedos que van desde los 0 hasta los 3200 msnm (Tabla 3). En el Nuevo Mundo la mayoría de las especies está distribuida en la selva y en menor frecuencia en las zonas arenosas. Son de vida nocturna con preferencias de temperaturas superiores de 18°C en ausencia de vientos (Killick *et al.*, 1986).

TABLA 3. Distribución de vectores causante de leishmaniasis en el Perú (Zorrilla *et al.*, 2017).

Especie de <i>Lutzomyia</i>	Especie de <i>Leishmania</i>	Método de incriminación vectorial	Provincia/ Departamento	Area geográfica	Referencias
Región andina					
<i>Lu. peruensis</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	Inoculación en hámster	Huachochiri (Lima)	Valle occidental	Herrer A. 1982
<i>Lu. peruensis</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	Dissección del tracto digestivo, PCR	Huachochiri (Lima)	Valle occidental	Pérez <i>et al.</i> 2007
<i>Lu. peruensis</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	Dissección del tracto digestivo	Otuzco (La Libertad)	Valle Interandino	Cruzado <i>et al.</i> 1997
<i>Lu. peruensis</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	Dissección, PCR, isoenzimas	Bolognesi (Ancash)	Valle Interandino	Pérez <i>et al.</i> 1991
<i>Lu. peruensis</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	PCR, Secuenciamiento de ADN	Otuzco (La Libertad)	Valle Interandino	Córdova <i>et al.</i> 2011
<i>Lu. verrucarum</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	Dissección, PCR, isoenzimas, transmisión experimental en hámster	Bolognesi (Ancash)	Valle Interandino	Pérez <i>et al.</i> 1991, Davies <i>et al.</i> 1993
<i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	Dissección tracto digestivo, PCR	Lucanas y Parinacochas (Ayacucho)	Valle Interandino	Cáceres <i>et al.</i> 2004
<i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	PCR, Secuenciamiento de ADN	Otuzco (La Libertad)	Valle Interandino	Córdova <i>et al.</i> 2011
<i>Lu. tejadai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i> / <i>L. (V.) peruviana</i> (híbrido)	PCR, Secuenciamiento de ADN	Ambo (Huánuco)	Valle Interandino	Kato <i>et al.</i> 2016
<i>Lu. pescei</i>	<i>L. (Viannia) spp.</i>	Correlación geográfica con casos humanos	Apurimac y Cusco	Valles Interandinos	Cáceres & Galati 2001
Región amazónica					
<i>Lu. yuilli yuilli</i>	<i>L. (Viannia) spp.</i>	PCR	Echarati, La Convención (Cusco)	Selva Alta	Paucar R. 2001
<i>Lu. chagasi</i>	<i>L. (Viannia) spp.</i>	Dissección, cultivo, PCR	Echarati, La Convención (Cusco)	Selva Alta	Paucar R. 2001
<i>Lu. auraensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	FRET Real Time PCR	Iberia (Madre de Dios)	Selva Baja	Valdivia <i>et al.</i> 2012
<i>Lu. auraensis</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>	FRET Real Time PCR	Iberia (Madre de Dios)	Selva Baja	Valdivia <i>et al.</i> 2012
<i>Lu. davisi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	FRET Real Time PCR	Iberia (Madre de Dios)	Selva Baja	Valdivia <i>et al.</i> 2012

2.4 Morfología y ciclo de vida de *Leishmania*

Leishmania presenta diferente morfología de acuerdo a su etapa. Según estudios de Handman (2001) tiene un ciclo de vida digénico (Figura 5). Se le conoce como promastigote nectómona cuando está localizado en el tubo digestivo del flebótomo (Killick-Kendrick *et al.*, 1986), en esta etapa el parásito posee un único flagelo y sus dimensiones son 15-25 µm x 2-4 µm. Según avanza hacia porciones anteriores del estómago el parásito toma forma más redondeada con acortamiento y engrosamiento del flagelo. Durante este estadio toma el nombre de promastigote haptómona y no es infectivo (Pimenta *et al.*, 1994).

Después de haber ingresado en el insecto (un aproximado de 10 días), los promastigotes no tienen capacidad de adherirse y se da un alargamiento flagelar en comparación con el cuerpo. Según Sacks y Perkins (1984), el promastigote pierde capacidad de multiplicarse, pero tiene más capacidad de infectar, en esta etapa se le denomina promastigote metacíclico y se ubica en la hipofaringe del insecto listo para inocularlo. Cuando el promastigote ingresa al macrófago del hospedador vertebrado se le denomina amastigote, presenta un tamaño entre 2-3 μm y pierde el flagelo (Walters, 1993).

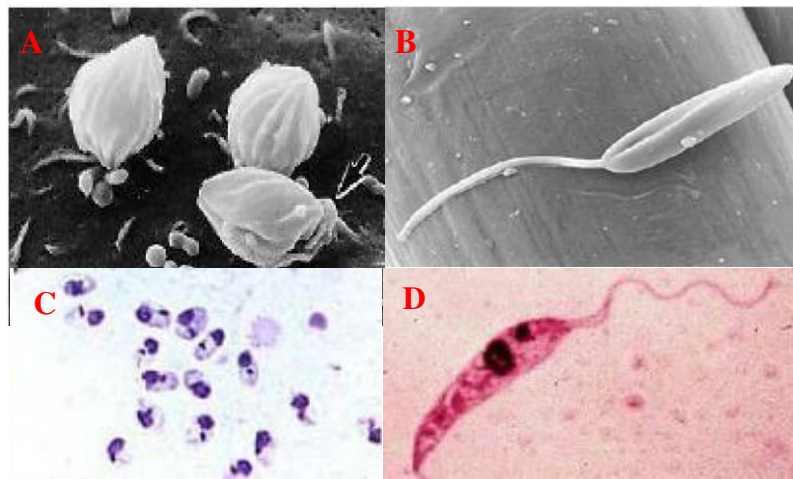


Figura 5. Estadios de *Leishmania*. **A y C:** Amastigote. **B y D:** Promastigote.

(<http://fundacionio.org/img/parasitology/img/leishmania6.jpg>)

Dentro de la célula hospedera, los parásitos se encuentran en estadio de amastigote por un tiempo de 24 horas. (Kamhawi, 2006; Bofante *et al.*, 2002). Posee una membrana plasmática de estructura de bicapa lipídica cubierta por glucocálix con un conjunto proteínas ancladas a su membrana (glicoproteína gp63, gp46 y el lipofosfoglicano LPG), este anclaje esta dado mediante estructuras glucosil fosfatidilinositol (GPI), que le confiere al parásito capacidad invasiva, (Englund, 1993). Según Lee *et al.* (1993) las glicoproteínas están relacionadas con su capacidad de replicación y el lipofosfoglicano participa en el anclaje a las vellosidades que revisten el intestino del insecto y en la unión entre el parásito y macrófago, así mismo, en la elaboración de óxido nítrico debido a la inhibición de la respuesta oxidativa de los macrófagos (Turco y Descoteaux, 1992). Los promastigotes presentan mayor capacidad de replicación que los amastigotes.

Existe una red de microtúbulos distribuidos helicoidalmente debajo de la membrana citoplasmática, que le brinda una forma más estable y le da movimiento contráctil. Oppenheimer y Michels, (1993) mencionan: “que el glucosoma es un orgánulo único en los Kinetoplastida que contiene las enzimas de las primeras etapas de la glucólisis y guarda semejanzas con los peroxisomas y glioxisomas de los eucariotas”. El megasoma es un orgánulo lisosomal que secreta enzimas como cisteín-proteasas en proporciones altas y está relacionada a la capacidad infectiva de los amastigotes (McKerrow *et al.*, 1993)”.

Se considera que los promastigotes de *Leishmania* tienen una propagación asexual (agamogonia) a través de la bipartición longitudinal, las formas metacíclicas del parásito no presentan división (Figura 6).

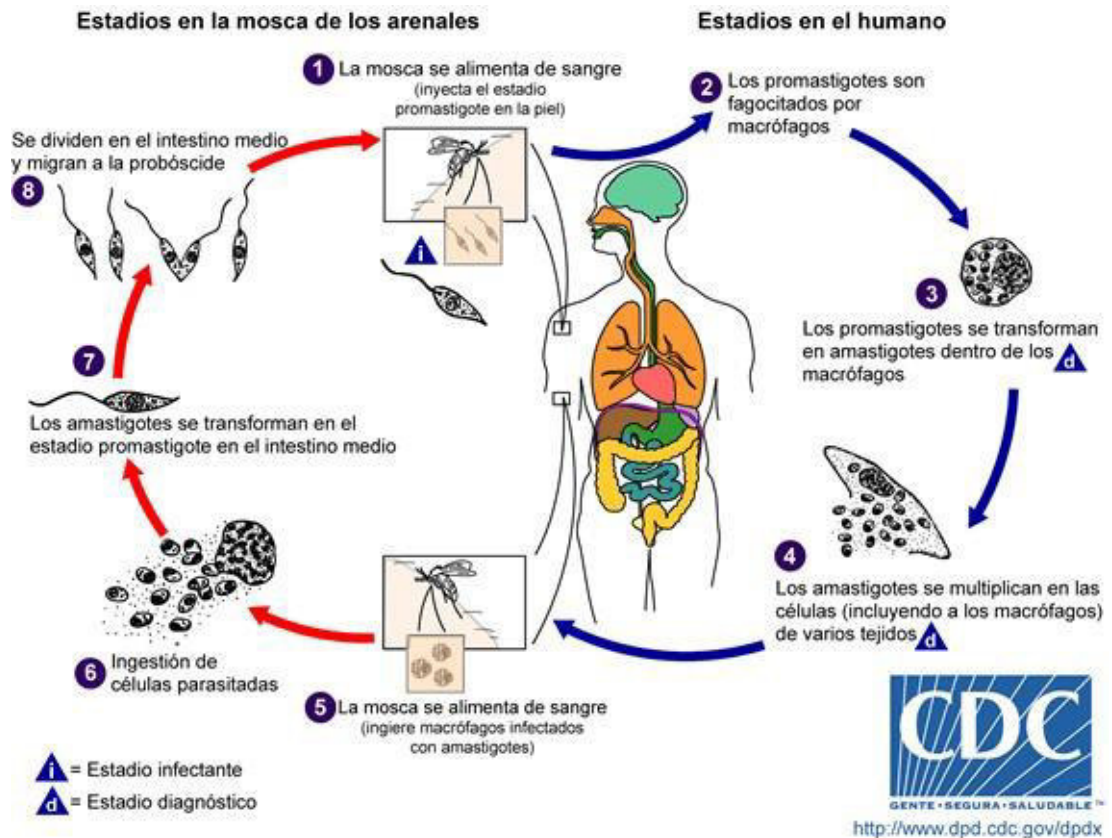


Figura 6. Ciclo de vida de la *Leishmania*. (Centers for Disease Control and Prevention, 2017. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>)

2.5 Respuesta inmune inducida por la infección con *Leishmania*

Respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa

La picadura del vector (insecto) induce en el hospedero una respuesta inflamatoria en el sitio de la lesión donde migran células como macrófagos y linfocitos para reestablecer el tejido dañado y dar lugar a la cicatrización. La complejidad de la respuesta inmunológica frente a una infección con *Leishmania* varía de acuerdo a varios factores como la forma clínica de la enfermedad, la cronicidad y de la especie implicada. Frente a la infección la respuesta inmunológica, a través de células y anticuerpos, activan mecanismos de inmunidad innata y adaptativa. En cultivos *in vitro* con antígenos para *Leishmania* se evidenció la respuesta de las células T a través

de reacciones de hipersensibilidad retardada y proliferación de linfocitos. Siendo con mayor frecuencia para leishmaniasis cutánea (Agudelo *et al.*, 2000). Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la enfermedad ya que son las células hospederas y además presentan al antígeno que más adelante activarán a las células T específicas, que producirán IFN- γ y TNF- α , importantes para el control de la enfermedad (Hernandez y Becker, 2007).

Una vez que se da el contacto entre el macrófago y los antígenos del parásito, las células presentadora de antígeno (CPA) se activan y los linfocitos T CD4+ y CD8+ se incrementan, secretando diversas citoquinas endógenas. (Scott, 1991, Rossi-Bergmann *et al.*, 1993). La regulación del granuloma se produce a través de las citoquinas de tipo Th1, como TNF- α e IFN- γ , y activan las células hospederas para aumentar su capacidad microbicida, así mismo, en seres humanos se induce la respuesta inmune humoral con los subtipos IgG1 e IgG3 y de IgG2a para ratones, mientras que la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata dada por linfocitos B regulan la producción de IgE a través de las citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) (Hernández-Ruiz, 2006).

En la leishmaniasis, la eliminación del parásito y curación de la afección va a depender de la producción de citoquinas activadoras del macrófago hospeder, sin embargo, si el macrófago no es activado por citoquinas va a conllevar a la afección. (Desjeux *et al.*, 1996). Es por ello que se considera de vital importancia los mecanismos de activación de respuesta de Th1 o Th2 los cuales dirigen la reacción inmunitaria que van a proteger y curar la enfermedad o en todo caso hacerla más susceptible y patogénica. En la LMC se ha registrado altos niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias IL-2, IL-5, TNF- α e IFN- γ , producidos por los linfocitos Th1 y Th2 (Agudelo, 2000). La enfermedad se ocasiona por la sobreactivación en la respuesta inmunológica y el bajo nivel de IL-10 por lo que la curación de la enfermedad estaría más relacionado a la producción de ciertas citoquinas en particular (Agudelo, 2000).

Es por ello la importancia de conocer el funcionamiento de las células dendríticas (DC), *Natural Killer* (NK) y macrófagos que participan en la respuesta inmunológica innata (Hernández-Ruiz *et al.*, 2006).

Respuesta Celular

La leishmaniasis posee varios fenotipos y de ello depende la respuesta inmune celular que se vaya a dar por parte del hospedero. En la población humana se presentan fenotipos resistentes y susceptibles. La gravedad de la enfermedad varía según el tipo de lesiones, algunas se curan naturalmente y otras son más severas que comprometen epitelios de la mucosa. En la leishmaniasis del tipo mucocutánea algunas lesiones se sanan naturalmente debido a la respuesta rápida y efectiva de los linfocitos T antígeno específicos, sin embargo, en la leishmaniasis tipo visceral y cutánea difusa la respuesta de las células T es débil o ausente (Cortázar *et al.*, 2006). El sistema inmunológico en el hospedero puede regular la expresión de las lesiones. Las citoquinas que más se producen en la leishmaniasis cutánea localizada son IFN- γ e IL-2, pero en leishmaniasis cutánea difusa es IL-10 y en mucocutánea es IL-4. Estudios en modelos murinos mostraron que las citoquinas proinflamatorias IL-2 e IFN- γ (Th1) participan en el restablecimiento de la infección, y existe relación entre IL4 e IL-10 (Th2) para el aumento y difusión de la infección respectivamente, indicando que las sub poblaciones de células T helper (Th1 y Th2) son cruciales para que no se dé la infección (Cortázar *et al.*, 2006).

Interleuquina 12 y *Leishmania*

La interleuquina IL-12 es una citoquina proinflamatoria producida por los linfocitos Th1 a través de macrófagos y células dendríticas humanas (Abbas, 2004). Posee una conformación heterodímera con uniones covalentes IL-12p40 e IL-12p35, donde la subunidad biológica activa es la proteína p70 que estimula

a las células natural killer y participa en producir y diferenciar a los linfocitos T CD4+ (Sevigny, 2007). La IL-12 es producida por los macrófagos (Gordon, 2003), actúa como mediador en la respuesta inmunológica adaptativa e innata, promueve la activación de la respuesta Th1 (Cappiello *et al.*, 2001), estimula la expresión de IFN- γ e induce a la diferenciación de células CD4+ a Th1. El incremento de expresión de IFN- γ disminuye los niveles de IL-4 permitiendo la curación de heridas. La interleuquina IL-12 también sobrerregularía la producción de IL-18, quien estaría actuando en sinergia para la producción de linfocitos Th1 (Sypek *et al.*, 1993; Trinchieri, 2003). La IL-12 estaría participando en otro tipo de respuesta inmunológica no adaptativa que se da a inicios de una infección, así como en el grado de inflamación local y estaría actuando en conjunto con otras citoquinas como IL-6, IL-1 α y β , IL-10, IL-18, TNF- α y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (Muphy *et al.*, 2007).

Frente a la leishmaniasis la respuesta inmunológica primordial es a nivel celular. En estudios en modelos de *Leishmania*-ratón se ha registrado que el avance de la enfermedad depende hacia donde derivan los linfocitos T CD4+: a la vía Th1 para proteger o hacia la víaTh2 para incrementar la respuesta dentro de su desarrollo. La IL-12 participa en la producción de otras citoquinas, como TNF- α y IFN- γ para estimular e incrementar las clonas de Th1, y en los macrófagos inducen la producción de óxido nítrico. Cuando las células B se activan llevan a cabo una diferenciación hacia clonas Th2 y favorecen la producción de las interleuquinas IL-4 e IL-10 que a su vez estimulan la expresión de TGF- β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Liese *et al.*, 2008).

En pacientes infectados con leishmaniasis se produce una respuesta inmunológica mediada por células T, particularmente CD4+. Se han reportado varios factores determinantes en la respuesta inmune como la cantidad de agente patógeno, los fluidos del mosquito, las células NK y una respuesta oportuna de las citoquinas. Cuando se produce IL-12 e IFN- γ se activa Th1 en las primeras fases de la lesión, sin embargo, IL-10 y TGF- β inhiben a los

linfocitos Th1 y activan a Th2, favoreciendo el desarrollo y crecimiento de *Leishmania* (Kaye *et al.*, 2011). Ribeiro *et al.* (1998) detectaron en algunos pacientes una respuesta positiva de hipersensibilidad retardada dirigida a Th1 proliferativa y se han relacionado a casos recurrentes que presentan infecciones sub-clínicas o reinfección. Esto indicaría que en infecciones crónicas hay una prevalencia de la respuesta de tipo Th2. Sin embargo, hay investigaciones que indican que el perfil de citoquinas varía según el tiempo de infección. Cuando hay contacto entre *Leishmania* y células dendríticas, durante la fagocitosis, IL-12 es secretada tempranamente (Quinones, 2000), aunque estudios en *L. mexicana* indican que frente a la infección existe una disminución en la secreción de IL-12 (Cameron *et al.*, 2004).

Carrera *et al.* (1996), observaron ausencia de la expresión de mRNA para TNF- α , iNOS e IL12p40 al enfrentar macrófagos murinos de cepas susceptibles y resistentes con *L. major*, sugiriendo que *L. major* induce la disminución de secreción de IL-12 al disminuir la expresión de mRNA. Audrey *et al.* (2002) demostraron que ambas subunidades de IL-12, p40 y p35, son necesarias para la respuesta continua contra la infección con *Leishmania major*. Por lo que jugarían un papel crítico en la inmunidad mediada por células previniendo la pérdida de células Th1 durante una infección.

Niño (2007) registró disminución de producción de nitritos en macrófagos murinos infectados con *L. amazonensis* y *L. braziliensis* y planteó que la vía iNOS estaría regulada a nivel post transcripcional y no a causa de la expresión de mRNA de la enzima como en otros tipos de *Leishmania*. Al igual, Rojas plantea una relación inversa entre la producción de IL-12 por el macrófago y el volumen de la vesícula parasitófora (VP). A mayor volumen de la VP, menos secreción de IL-12. Al mismo tiempo, sugiere que los cambios del tráfico vesicular podrían ser a causa del volumen de los fagosomas que serían considerados como factores inespecíficos frente a la infección por *Leishmania* (Rojas, 2013).

TNF alfa y *Leishmania*

TNF- α , es una citoquina pro-inflamatoria secretada por los macrófagos para la eliminación de patógenos y actúa en la inducción de procesos inflamatorios tisulares inmunomediados (Lubberts, 2010). Interviene en la inmunidad innata y adaptativa, en la producción celular y en procesos apoptóticos. Es secretado por macrófagos, monocitos, células T, células musculares, adipocitos y fibroblastos (Popa *et al.*, 2007). Su principal secretor son los macrófagos y se han registrado mayor producción de TNF- α en infecciones frente a malaria, meningitis y en fases iniciales de leishmaniasis (Ritter *et al.*, 2008).

Liew *et al.* (1990) estudiaron la acción de TNF- α en ratones Balb/c infectados con *Leishmania major*, y determinaron que las lesiones eran significativamente más grandes cuando se les inyectaron anticuerpos específicos contra TNF- α de conejo en comparación con el grupo control inyectados con inmunoglobulina normal de conejo. Por lo que consideraron que TNF- α activa macrófagos para eliminar a *Leishmania in vitro* y demostraron que TNF- α juega un papel importante en la mediación de la protección del hospedero contra la leishmaniasis cutánea. Lo mismo llegó a concluir Wilhelm *et al.* (2001) determinando que en ausencia de la citoquina proinflamatoria TNF- α , la protección contra *L. major* se afecta gravemente, lo que da lugar a una infección progresiva y, finalmente, a un desenlace fatal.

Lage *et al.* (2007) estudiaron la expresión de TNF- α en grupo de animales infectados con *Leishmania* sp. y encontraron diferencias significativas al analizar y comparar el bazo entre el grupo infectado y control a pesar que el grupo infectado se mostraba asintomático.

Estudios en ratones infectados con *L. (Viannia) braziliensis*, registraron un incremento en la expresión de TNF- α en relación a las no infectadas,

indicando que TNF- α contribuiría al control local de la infección (Carvalho *et al.*, 2008).

Otros autores determinaron que los macrófagos secretan TNF- α e IL-1, para aumentar la eficiencia en la fagocitosis y la acción de los linfocitos T citotóxicos (Bryson, 2005; Kushawaha *et al.*, 2011).

Receptores tipo *Toll* y *Leishmania*

La primera descripción de los receptores tipo *Toll* se realizó por los años 1988 cuando se estudiaba al gen receptor de IL-1 (Gay y Keith, 1991). Nomura *et al.* (1994) describieron el primer TLR humano, pero es en el año 1996 donde se le denomina como receptor *Toll like* (Lemaitre *et al.*, 1996).

Los receptores del tipo *Toll* (TLR) son proteínas de membrana que confieren especificidad a las células de inmunidad innata gracias al reconocimiento de patógenos. Actualmente la familia de los TLRs se compone de 23 miembros (TLR-1 al TLR-23), pero no todos están caracterizados ni están presentes en todas las especies. En la especie humana no se encuentran los TLR-11, TLR-12 y TLR-13; en ratón no está presente el TLR-10. (Underhill, 2004; Underhill y Gantner, 2004). Los TLR reconocen las estructuras conservadas de los microbios y al hacerlo se activa la vía de señalización como resultado de una respuesta inmune. Estudios recientes han demostrado que los TLRs presentan proteínas transmembrana con un dominio extracelular que se caracteriza por tener repeticiones de secuencias con un motivo con residuos de leucina de al menos 19 a 25 aminoácidos (LRR: *Leucine-Rich Repeat*) y un dominio intracelular TIR (Toll- IL1R) similar al receptor de IL-1 de los mamíferos que media en la transducción de señales dentro de la célula cuya principal función es el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Figura 7).

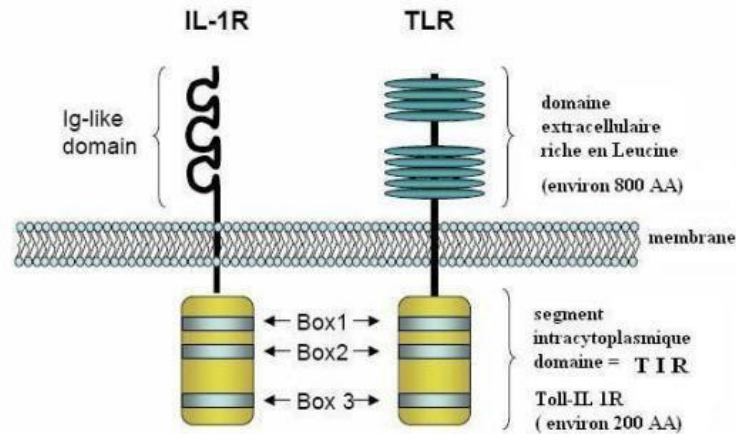


Figura 7. Comparación de la estructura del receptor de IL-1 β y receptores TLR.

(<http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunit-e-etvaccination>).

Frente a la leishmaniasis se va a activar la respuesta inmune innata, activándose los TLRs que están en macrófagos, células asesinas naturales y células dendríticas que inducen, primeramente, síntesis de péptidos antibacterianos como la atocina y antifúngicos como la drosomicina (Tauszig-Jouanguy *et al.*, 2000). Los TLRs reconocen moléculas en la superficie del parásito, existen estudios previos de reconocimiento de los TLRs frente a *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma* (Adachi *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2001; Flandin *et al.*, 2006). Los TLRs se unen a través de sus dominios, que poseen zonas repetitivas ricas en leucina y reconocen moléculas glicolípídicas: LPG y gp63 que se encuentra en la superficie de los promastigotes los cuales van a inducir respuestas inmunitarias produciendo citoquinas proinflamatorias: IL-12, TNF- α y IFN- γ y moléculas coestimuladoras (Hernandez y Becker, 2007).

Los receptores TLR-3 y TLR-9 se localizan intracelularmente y están relacionados a endosomas. El TLR-3 se activa por ácidos nucleicos, especialmente por RNA de doble cadena por lo que se especializa en la respuesta frente a virus (Figura 8). Cuando se detecta estas macromoléculas, el TLR-3 activa la señalización de NF- κ B (Alexopoulou *et al.*, 2001). Al parecer

los dominios intracelulares del receptor se mantienen más conservados entre los TLR, como se presenta en el gen TLR-4 de ratón y humano con un 83% de similitud (Moreno, 2003) a diferencia de regiones extracelulares que son de mayor variabilidad porque se activan por distintos ligandos.

Existen diversos estudios acerca de la importancia de los TLRs en el reconocimiento de diversos parásitos y se ha investigado el rol de estas moléculas en leishmaniasis (Adachi *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2001). Flandin *et al.* (2006), demostraron que el TLR-3 participa en el reconocimiento de *Leishmania donovani* y es necesario para la producción de óxido nítrico y fagocitosis del parásito, por lo tanto, una regulación baja de TLR-3 favorecería la progresión de la enfermedad. Utilizando un modelo de hámster, Ives *et al.* (2011) demostraron que *Leishmania guyanensis* tiene una alta carga de virus de RNA de *Leishmania* (LRV1) que es reconocido por TLR-3 para inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimosinas y la exacerbación de la enfermedad.

El TLR-4 se expresa en la superficie celular y cuando se activa por reconocimiento del ligando, migra a los fagosomas, estos TLRs expresados en la membrana celular van a reconocer moléculas como los lipopolipéptidos y lipopolisacáridos que van a indicar la presencia de patógenos como bacterias protozoos y hongos que podrían estar en el espacio intracelular. Existen diversos estudios relacionando la expresión de TLR frente a la infección con *Leishmania*. Tolouei *et al.* (2013) investigaron la expresión de TLR-2 y TLR-4 en pacientes con leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania major* y reportaron que la expresión génica de las proteínas de TLR-2 y TLR-4 en macrófagos de los pacientes con forma de lesión curativa fueron significativamente más altos que los de pacientes con forma de lesión no curativa. El TLR-4 se requiere para el control adecuado del parásito, probablemente debido a la producción iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible) que conduce la síntesis de óxido nítrico llevando a la muerte de *Leishmania* (Oliveira *et al.*, 2004; Kropf *et al.*, 2004; Bennouna *et al.*, 2006).

El receptor TLR-9 está localizado a nivel del retículo endoplasmático y se traslada a los endosomas cuando hay estímulo; en los humanos va a encontrarse dentro de los linfocitos B y en células dendríticas (Hornung *et al.*, 2002) y en ratones se encuentran en macrófagos, linfocitos B y células dendríticas mieloides (Hemmi *et al.*, 2000). Li *et al.* (2004) demostraron la producción de IL-12 a través de TLR-9 en ratones infectados con *Leishmania major*, planteando que ambos estarían actuando en sinergia. Agostinho *et al.* (2018) realizaron un estudio comparativo en la infección de monocitos humanos *in vitro* con *L. infantum* y *L. braziliensis* y determinaron que la expresión de TLR-2, el TLR-9 fue menor en *L. infantum* en comparación con las células infectadas por *L. braziliensis*; además, los monocitos infectados por *L. infantum* produjeron menos TNF- α y una menor relación TNF- α / IL10, lo que resulta en un perfil inflamatorio más débil y un control de *Leishmania* 100 veces menos efectivo que las células infectadas con *Leishmania braziliensis*.

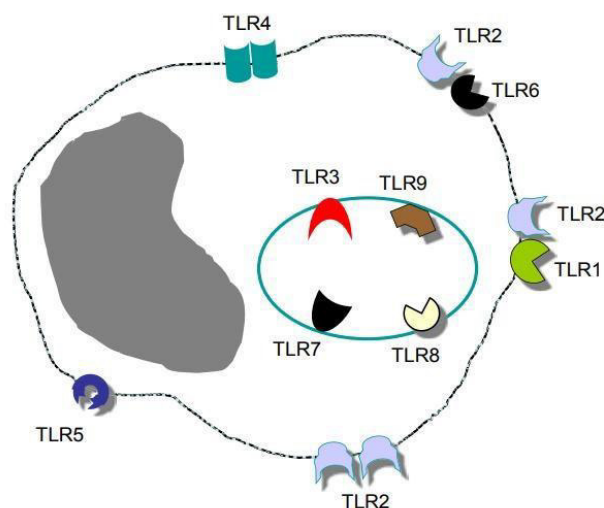


Figura 8. Esquema de la localización de los TLRs en una célula.

TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-6 se encuentran en la membrana plasmática y TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9 se encuentran en el citoplasma de la célula dentro de los endosomas.

(Kuzemtseva, 2012).

2.6 Técnicas para detectar la expresión de genes

La técnica de *northern blotting* es un método comúnmente utilizado donde el RNA es purificado y separado mediante electroforesis en gel de agarosa y detectado por sondas específicas de DNA (Smith y Old, 1993). Esta técnica sigue siendo utilizada para estudiar la expresión genética a nivel celular, sin embargo, requiere cantidades mayores de mRNA, lo cual dificulta su aplicación cuando se tiene cantidades menores de mRNA (McGuire *et al.*, 2004).

La técnica de cuantificación de PCR en tiempo real (qPCR) supera esta limitación ya que está basada en una reacción en cadena de polimerasa (PCR) que amplifica y cuantifica la cantidad específica de DNA o cDNA permitiendo obtener valores más confiables y exactos de la expresión génica en el estudio (Heid *et al.*, 1996).

El qPCR es capaz de producir amplicones muy pequeños de hasta 60 pb y resulta ser eficiente para cuantificar cambios y variaciones pequeñas en la expresión génica en estudios celulares, así mismo se puede cuantificar niveles de expresión de mRNA en ejemplares o tejidos que poseen parcialmente degradado el RNA (Bustin, 2005).

La ventaja de la prueba es que brinda mayor sensibilidad y especificidad (Dorak, 2008). Es una técnica que viene siendo usada para detectar la expresión de genes en diferentes especies de *Leishmania*.

(Montalvo *et al.*, 2014; Antinori *et al.*, 2009; Deborggraeve *et al.*, 2008).

En la prueba qPCR los productos del amplificado se miden al finalizar cada ciclo de amplificado. Los resultados se analizan mediante el uso de

software informáticos que miden la expresión relativa de los genes mediante el número de copias de mRNA producido entre las muestras en estudio (Heid *et al.*, 1996).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El parásito *Leishmania braziliensis* activa la expresión transcripcional de los receptores tipo *Toll*: TLR-3, TLR-4 y TLR-9 y de las citoquinas

proinflamatorias: IL-12 y TNF- α en cultivo de macrófagos peritoneales murinos.

3.2 Objetivo general

Detección y cuantificación de la expresión de mRNA de los receptores del tipo *toll*: TLR-3, TLR-4 y TLR-9 y de dos citoquinas proinflamatorias: IL-12 y TNF- α en macrófagos peritoneales murinos infectados con una cepa autóctona de *Leishmania braziliensis*.

3.3 Objetivos específicos

- a. Caracterización de la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* aislada de un caso reportado en Perú, mediante secuenciamiento de DNA.
- b. Evaluación de las características morfológicas de macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis* cepa C234, *in vitro*.
- c. Detección y cuantificación de los niveles de óxido nítrico producidos por macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis*.
- d. Cuantificación de la expresión de mRNA para los receptores TLR-3, TLR-4 y TLR-9 en macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis in vitro*.
- e. Cuantificación de la expresión de mRNA para citoquinas IL-12 y TNF- α en macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis*.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA C234 DE *Leishmania* MEDIANTE SECUENCIAMIENTO DE DNA

4.1.1 Cultivo de *Leishmania*

La cepa de *Leishmania* C234, fue aislada de un exudado de la herida de un paciente con leishmaniasis de tipo cutáneo proveniente de la selva del Perú y al momento de la donación se hallaba en el pasaje número 234. Fue donada amablemente en estadio de promastigote por el Laboratorio de Zoonosis del Instituto Nacional de Salud, en vial con medio bifásico de agar sangre (Anexo 3).

Se prepararon tubos tapa rosca con 3 ml de agar sangre al 10% en plano inclinado a manera “pico de flauta” y se adicionó 2 ml de medio acuoso para formar la fase liquida del agar bifásico (Anexo 3). Los promastigotes de *Leishmania* fueron resuspendidos en el medio acuoso de los tubos de agar sangre. Se incubaron los tubos al 5% de CO₂ a 37°C. Se obtuvo un promedio de $3,2 \times 10^5$ cel/ml de la cepa C234 de *Leishmania*.

Seguidamente se realizó el proceso de extracción de DNA y se mantuvo la cepa para posteriores pruebas (Figura 9). Todo el proceso se realizó en cabina de bioseguridad, considerando las precauciones del caso.



Figura 9. Cultivo de *Leishmania braziliensis* en incubadora de CO₂. El parásito fue cultivado en medio bifásico de agar sangre al 10%.

4.1.2 Extracción de DNA de *Leishmania*

Se realizó la extracción del DNA de *Leishmania* al cuarto día de cultivo. Los promastigotes de *Leishmania* fueron aislados y se procedió a la extracción de DNA con el kit de extracción *QIAamp DNA Mini Kit* siguiendo el protocolo establecido por Qiagen, Alemania (Anexo 4). Los reactivos para la extracción (buffer AVE) se temperaron antes de procesar; se trabajó con material de plástico libre de RNasas y en cabina de bioseguridad.

Del tubo de cultivo en medio bifásico, se transfirió a un tubo cónico el sobrenadante de la fase líquida de los cultivos de *Leishmania*, aproximadamente 30 ml de sobrenadante de cultivo, y se procedió a lavar con buffer fosfato salino (PBS) estéril centrifugando a 3000 rpm por 10 minutos tres veces, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 200 µl de agua estéril Mili-Q. Se pipeteó 900 µl de buffer AVL (buffer de lisis) en un criovial. Se adicionó 140 µl del total de la muestra (solución salina y *Leishmania*) al criovial con el buffer AVL y se adicionó 50 µl de proteinasa K, se mezcló en vortex por 15 segundos y se incubó a 60°C durante 3 horas, luego se centrifugó el criovial a 10 000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante adicionando 560 µl de etanol absoluto y se incubó el criovial a 20°C por una hora. Se concentró el DNA centrifugando a 10 000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*. Se adicionó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante y conservó el *pellet*. Se incubó el *pellet* a 60°C por 20 minutos para separar residuos de etanol, seguidamente se adicionó al criovial 30 µl de buffer TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM) y se conservó el DNA a -20°C.

4.1.3 Cuantificación de DNA extraído

La medición de la concentración de DNA extraído en la solución se realizó mediante espectrofotometría UV en un espectrofotómetro (UNICO

modelo 2100 UV). Se tomaron los valores de la densidad óptica (D.O.) en longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, para medir la concentración del DNA en cada cultivo, sabiendo que 50 µg/ml equivale 1 D.O. de DNA de doble cadena. Para hallar la concentración de DNA se relacionó los valores obtenidos a 260 nm y 280 nm, y se consideró como DNA puro los valores percibidos entre 1,8 y 2, los valores obtenidos por debajo de este valor indican contaminación con fenol o proteínas (Sambrook *et al.*, 1989).

Se procedió a diluir el DNA a 1/10 en un volumen final de 200 µl (20 µl de DNA y 180 µl de buffer TE estéril (1 mM EDTA, 10 mM tris, pH 7.5), se consideró como blanco al buffer TE. Se midió y registró el valor de la D.O. a 260 y 280 nm.

Se estimó la concentración de DNA en la muestra utilizando la siguiente relación:

$$[\text{DNA}] = 50 \mu\text{g.ml}^{-1} \times \text{D.O.}_{260\text{nm}} \times \text{factor de dilución}$$

Para el estudio se trabajó con las muestras de DNA que obtuvieron buenos patrones de cantidad, calidad e integridad.

4.1.4 Primers

Se utilizaron *primers* cebadores para la amplificación de secuencias completas de minicírculos de ácido desoxirribonucleico de kinetoplasto (kDNA) para *Leishmania* sp. los cuales fueron diseñados previamente por Marcussi *et al.* (2008) para la detección, mediante PCR, de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. Las secuencias fueron analizadas en el *GenBank* para posteriormente realizar el secuenciamiento.

Para analizar la eficacia de los *primer* se usaron los programas *Primer BLAST* con *link* en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast), luego el instrumento bioinformático *Oligoanalyzer Tool* para identificar la cantidad de Guanina - Citocina, presencia de horquillas, formación de dímeros y la temperatura de *melting* o de fusión TM, con la finalidad de sintetizar *primers* específicos (Cano *et al.*, 2010). Todos los *primers* sintetizados en la casa comercial *INMUNOCHEM*, fueron estandarizados individualmente para cada caso (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencia del *Primer* empleado para la identificación de *Leishmania* (Marcussi *et al.*, 2008).

Nombre del Primer	SECUENCIA	Tamaño del producto (pb)	Posición en el genoma	T m
LBF1	AAATTCGCGTTTTTTGGCCTCCCCG	536	185-209	66.2
LBR1	GCATAAACTAGAGACGGAACAGAG		643-620	62.9

4.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa directa para amplificar minicírculos de kDNA de *Leishmania braziliensis*

Se preparó la mezcla de reacción considerando todos los cuidados necesarios para evitar contaminación de otro origen. Se varió las condiciones de los diversos componentes para optimizar la reacción de amplificación hasta conseguir la más adecuada. Para la reacción de PCR se trabajó con mezclas en volumen final de 25 µl, que contenían: 10 ng de DNA total, 0.5 uM de cada *primer* (LBF1 y LBR1), 2.5 mM de los dNTPs (dTTP, dGTP, dCTP y dATP) de marca *GeneAmp®*, *INVITROGEN*, 2 mM MgCl₂, enzima Taq polimerasa 2.5 µl/ reacción y Buffer de PCR 10X (sin MgCl₂) marca *Platinum® Taq DNA*

Polymerase, INVITROGEN. Se amplificaron las muestras en un Termociclador modelo 2720 Applied Biosystem con las siguientes condiciones: 94°C por 15 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos y 72°C por un minuto, seguidamente de 72 °C por 7 minutos y 4°C (Figura 10).

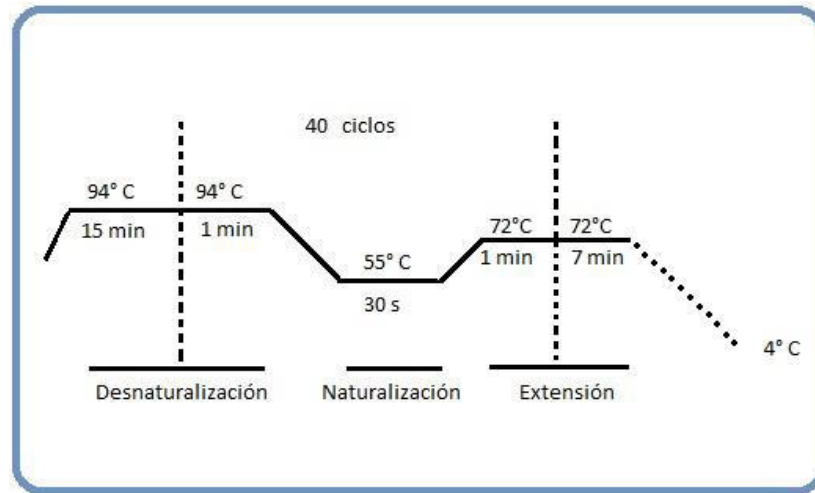


Figura 10. Programa de Amplificación del *Primer* LBF1 y LBR1 para *Leishmania*.

4.1.6 Electroforesis del producto amplificado

Para detectar y visualizar los productos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los amplificados de DNA, así como purificarlos, para ello se preparó agarosa a 1.5% (1.5 g de agarosa *Low meelting* en 100 ml de agua destilada) se licuó en microondas por 3 minutos en frasco pírex, se enfrió a una temperatura de 45°C aproximadamente y se colocó en la cámara de electroforesis horizontal modelo *Mini-Sub® Cell GT* marca Bio-rad y se dejó solidificar, se añadió TAE 1X hasta cubrir el gel de agarosa y se colocó 8 µl de DNA y 2 µl de buffer de carga a 0,5 µg/ml, se aplicó un voltaje de 120V, por 40 minutos.

Se visualizaron los fragmentos de ácidos nucleicos a través de fotografiado con un sistema de documentación en gel con cámara CCD con transiluminador mediante el *software Gel Doc TM 1000 system* de marca *Bio-rad*. El marcador de peso molecular (100-1000 pares de bases marca Sigma) fue utilizado para determinar peso molecular de los amplificados de DNA. El producto amplificado fue de un aproximado de 536 pares de bases (Figura 18).

4.1.7 Purificación del producto amplificado

Después de la secuenciación los fragmentos amplificados se purificaron de manera indirecta desde el gel de agarosa, para ello se cortaron con un bisturí estéril las bandas de amplificación del gel. En el proceso se empleó el kit comercial: *QIAquick-Gel Extraction kit* (marca Qiagen), siguiendo las instrucciones del inserto. Se eluyó el DNA obtenido en 50-100 µl de agua ultra pura.

4.1.8 Secuenciamiento genético

A partir del producto purificado, se realizó la reacción de *Bigdye* utilizando el kit comercial *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Perkin-Elmer), se utilizó los *primers* LBF1 y LBR1, la mezcla se realizó siguiendo la indicación de la casa comercial en un volumen final de reacción de 15 µl donde los componentes de la mezcla para cada reacción fue: 4 µl de Buffer 5X de Bigdye, 2 µl de Bigdye, 1 µl de primer (3,2 pmol), 3 µl de DNA purificado y 5 µl de agua libre de RNasa y DNasa. Toda la mezcla se llevó a un ciclaje de secuenciamiento de 94°C por 3 minutos y 24 ciclos a 96°C en un tiempo de 30 segundos, 51°C por 30 segundos, finalmente

4

minutos a 60°C. La secuenciación se realizó usando un secuenciador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems*.

4.1.9 Análisis molecular de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron editadas, alineadas y comparadas entre ellas para hallar la secuencia consenso a través del programa bioinformático CLUSTAL X de versión 1,83. Posteriormente estas secuencias fueron confrontadas con otras secuencias existentes el *GenBank* a través del programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponible en la página web del NCBI, www.blast.ncbi.nlm.nih.gov.

El análisis filogenético se realizó mediante el programa MEGA versión 5.10 (Tamura *et al.*, 2007), utilizando el método Neighbor Joining, modelo Tamura-Nei de 1000 repeticiones. El análisis de las secuencias se hizo con el *software SeqMan (Dnastar Inc., Wisconsin, E.U.A.)*.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *Leishmania braziliensis*

Se trabajó con ratones machos de la línea Balb/c obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), Todos los ratones fueron de aproximadamente 8 semanas de edad, se les condicionó en jaulas individuales dentro del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, para su adaptación (Figura 11). Se mantuvieron a los animales a las mismas condiciones de alimentación del INS.



Figura 11. Ratones Balb/c de 8 semanas en proceso de adaptación.

4.2.1 Obtención de macrófagos murinos

A los ratones Balb/c se inoculó 1.5 ml de caldo tioglicolato autoclavado vía ip., después de tres días, con una segunda inoculación (1 ml de RPMI) por vía ip, 15 minutos después se anestesiaron en cámara de cloroformo y se sacrificaron por dislocación cervical. Seguidamente se procedió a desinfectar la parte ventral con abundante alcohol yodado se fijó al ratón en un soporte con alfileres y se recuperaron los macrófagos de la cavidad peritoneal en tubos cónicos refrigerados y se centrifugaron dos veces con PBS 1X frío a 1000 rpm durante 7 minutos.

El taco celular se resuspendió en 3 ml de RPMI 1640 marca GIBCO preparado con antibióticos y 10% de suero bovino fetal, se mezcló y se extendió en placas petri estériles e incubó a 33°C en cámara de CO₂ al 5% por 1 hora para conseguir que los macrófagos se adhieran a la base de la placa, después se procedió a eliminar el sobrenadante y hacer lavados de la superficie de la placa con PBS 1X a temperatura ambiente para luego incorporar 2 ml de medio RPMI 1640 suplementado y cosechar en tubo cónico todas las células adheridas a la superficie, se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos y el taco celular se resuspendió en la cantidad necesaria de medio RPMI con hepes, antibióticos y suplementado con suero bovino fetal, posteriormente se adicionó en placas de base plana para su posterior

infección con *Leishmania braziliensis*. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad (Figura 12).



FIGURA 12. Tratamiento para la obtención de macrófagos peritoneales en ratones Balb/c. **A:** Inoculación de caldo tioglicolato vía intraperitoneal. **B:** Obtención de macrófagos peritoneales. **C:** Macrófagos murinos al microscopio, (40X).

4.2.2 Infección de macrófagos murinos con *Leishmania braziliensis*

Se procedió cosechando los promastigotes de *Leishmania braziliensis* en fase logarítmica $3,2 \times 10^5$ parásitos/ml, se colectó la fase líquida y se procedió a centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos y se resuspendió en medio RPMI 1640 con un número de parásitos de 1×10^5 parásitos/ml para realizar la infección de macrófagos. Se infectaron a una proporción de 1:10 macrófago: parásitos, y se mantuvieron a 37°C, a una atmósfera de 5% de CO₂ y se analizaron al inicio y al final (después de 24 y 48 horas). Los cultivos se realizaron por triplicado, la viabilidad se verificó utilizando azul de tripano (Figura 13).

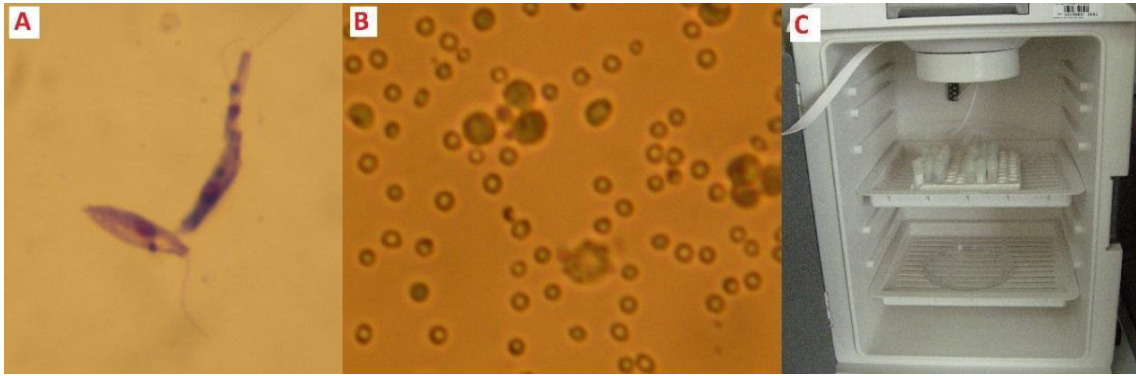


Figura 13. Preparación de muestra para posterior infección de macrófagos murinos con *Leishmania braziliensis*. **A:** promastigote de *Leishmania braziliensis*. **B:** Macrófago murino. **C:** Cultivo por triplicado en microtubos al 5% de CO₂.

Se determinó la capacidad de infección (CI) del parásito, usando los reportes realizados por Monzote *et al.* (2006) donde CI es el resultado del valor promedio de amastigotes en macrófagos infectados por el porcentaje de macrófagos infectados en el cultivo.

Para hallar un porcentaje de afección y la cantidad de amastigotes por macrófago se analizó al microscopio óptico (100x) un promedio de 100 células infectadas.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO PRODUCIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEALES INFECTADOS CON *Leishmania braziliensis*

La producción de óxido nítrico se midió por la reacción de Peter Griess. Se midió en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos la acumulación de nitritos que indicaría la producción de óxido nítrico por macrófagos activados

o residentes. Los sobrenadantes fueron colectados después del período de incubación y se cuantificaron los rangos de nitritos a las 0,24 y 48 horas, utilizando el reactivo de Peter Griess (Anexo 5). Para ello, se mezclaron 100 µl del sobrenadante de cada cultivo con 100 µl del reactivo de Peter Griess (50 µl de solución A + 50 µl de solución B) y se dejó reaccionar por 1 minuto y se hizo la lectura de la absorbancia en un lector de ELISA, como estándar se empleó el nitrito de sodio y se halló la curva estándar de producción de óxido nítrico a diferentes diluciones de nitrito y se trabajó con los valores de absorbancia. Las lecturas se realizaron a una densidad óptica de 540 nm (Figura 26).

Para el análisis estadístico, el promedio y la desviación estándar de la producción de óxido nítrico en el grupo de macrófagos infectados y no infectados fueron definitivos con el software Microsoft Excel 2016; se aplicó la prueba t-Student de muestras independientes para realizar el estudio estadístico y hallar significancia ($p < 0,05$).

4.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES TLR-3, TLR-4 Y TLR-9 EN MACRÓFAGOS PERITONEALES INFECTADOS CON *Leishmania braziliensis*

4.4.1 Extracción de RNA

Para analizar la expresión de mRNA de TLR-3, TLR-4 y TLR-9 se consideraron todos los cultivos que resultaron positivos para la producción de óxido nítrico; la extracción de RNA de los macrófagos se realizó mediante el uso del *kit Power SyBr Green Cell-To TM (Applied Biosystem)*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los cultivos se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y fueron transferidos a un tubo, se le añadió solución de lisado (50 µl), e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se adicionó la solución *stop* (5 µl) y se dejó incubando por 2 minutos a temperatura ambiente. Se calculó la concentración mediante espectrofotometría y se utilizó este valor como valor indicativo aproximado de la cantidad de RNA para realizar la transcripción reversa mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por tiempo real (qRT-PCR) (Sambrook y Russell, 2001). Se analizaron los cultivos positivos a las 24 horas de infección.

4.4.2 Retrotranscripción a DNA complementario (cDNA)

Del RNA extraído en el paso anterior se procedió a realizar una transcripción reversa por la enzima RT para sintetizar cDNA, para este proceso se emplearon los reactivos que incluye el *kit Power SyBr Green Cell-To TM*, siguiendo las indicaciones del protocolo. Para ello se adicionó el RT *master mix* a cada tubo con 20 µl correspondiente al RNA procedente de los cultivos de macrófagos activados por los promastigotes de *Leishmania*, se procesó en un termociclador (*Applied Biosystems, modelo: GeneAmp PCR 9700*) con un programa de incubación de 37°C por 60 minutos para la síntesis de cDNA y 95°C por 5 minutos para la desnaturalización de la enzima. Una vez concluido el procedimiento, el cDNA se almacenó a - 20°C.

4.4.3 Selección de *Primers* para TLR-3, TLR-4 y TLR-9

Se analizó diversas fuentes bibliográficas para determinar las secuencias de los *primers* empleados en el estudio para las copias de los genes TLR-3, TLR-4, TLR-9 y Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizado para normalizar los valores de los amplificados obtenidos de la qRT-PCR llamado también *housekeeping* que actúa controlando la expresión de los genes (Ullmannovi, 2003; Willems *et al.*, 2006, Las secuencias de los genes seleccionados fueron previamente descritos por Charmoy *et al.* (2007), quienes estudiaron su expresión en ratones de la línea Balb/c.

Todos los *primers* se analizaron mediante las herramientas bioinformáticas: *Oligoanalyzer 3,1* y *Primer BLAST* descritas anteriormente, para determinar su eficiencia (Figura 14). Seguidamente se mandó a sintetizar los primers a la casa comercial *Invitrogen Life Technologies*® para TLR-3, TLR-4 y TLR-9, así mismo el *primer* del gen de referencia GAPDH. Todos los *primers* se sintetizaron a una concentración de 50 nM y fueron diluidos a 10 µM para realizar el qPCR en tiempo real. Las secuencias de los *primers* utilizados, así como el tamaño esperado de los transcritos amplificado para cada uno se detallan en la Tabla 5.

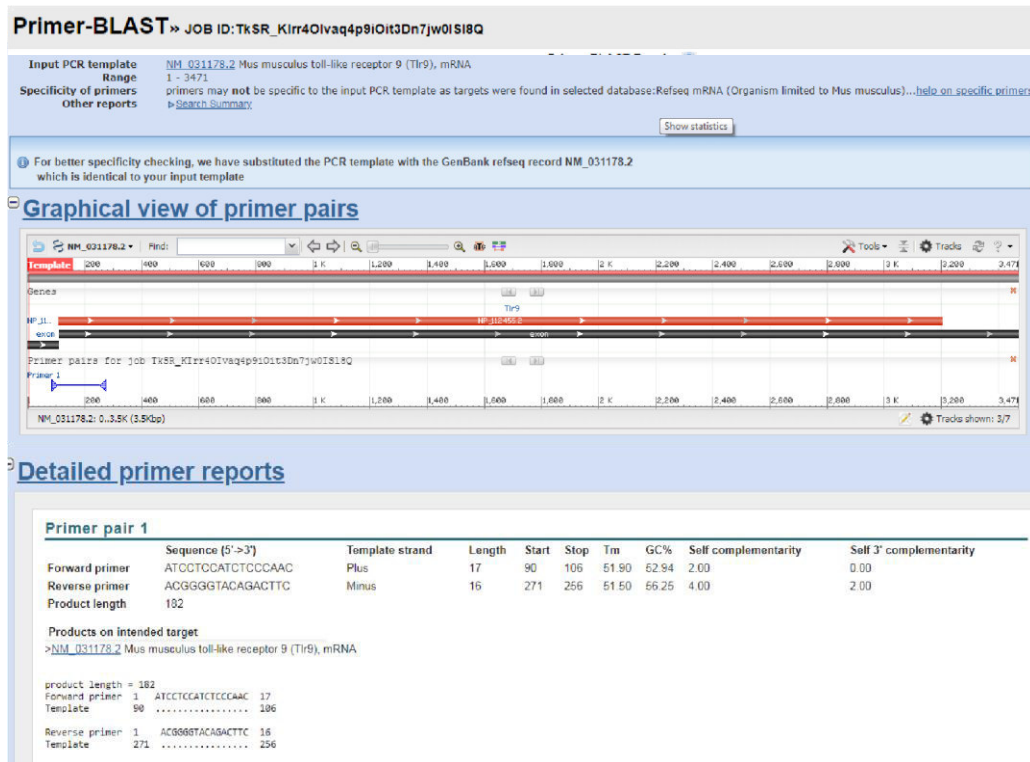


Figura 14. Análisis de la secuencia de los *primers* del gen TLR-9 a través del *Software Primer-Blast*. La secuencia analizada es específica para TLR-9 de *Mus musculus*.

Tabla 5. Lista de *primers* utilizados para la expresión de receptores tipo *Toll* mediante qRT-PCR.

Gen	Secuencia de los <i>primers</i> (5´- 3´)	Tamaño del amplificado (pb)	Numero de acceso al GenBank
TRL-3	FW: TTGTCTTCTGCACGAACCTG RV: CGCAACGCAAGGATTTTATT	186	NM_126166.5
TLR-4	FW: GGACTCTGATCATGGCACTG RV: ACTACCTCTATGCAGGGA	520	NM_021297.3
TLR9	FW: ATCCTCCATCTCCCAAC RV: ACGGGGTACAGACTTC	167	NM_031178.2
GAPDH mouse	FW: CTA CTGGTGTCTTCACCACC RV: GTGGCAGTGATGGCATGGAC	258	NM_008084

4.4.4 Amplificación de cDNA de los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 mediante qRT-PCR

Para cuantificar la expresión de los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 se sintetizaron los *primers* para cada gen en la casa comercial INVITROGEN, se utilizó el kit *Master Mix Power SyBrGreen PCR* (marca *Applied Biosystem*) y el mix de *SyBr Green* para realizar la amplificación de cDNA. Se empleó un termociclador marca *Corbett*, Modelo *rotor gene 3000* para realizar el qRT-PCR. Los resultados fueron analizados utilizando el *Software Rotor Gene Software 1.7* y los resultados se compararon con una curva estándar creada con el gen de referencia *GAPDH Mouse*.

Para la prueba se realizó en tubos ópticos la mezcla de reacción: 1 µl del *primer Forward* y 1 µl del *primer Reverse* (10 µM), 10 µl de la mezcla Master y 4 µl de agua para PCR. Se añadió a la mezcla 5 µl de cDNA extraído previamente diluido con agua ultra pura (1:3) siendo finalmente un volumen de 20 µl. La concentración final de los *primers* fue de 500 nM y de cDNA fue de 2.7 µg/µl (considerando una eficiencia del 100% de RT-PCR), se le añadió agua pura en vez de cDNA en los tubos con la mezcla de reacción para control negativo.

Las muestras se corrieron por triplicado, se utilizó las mismas condiciones de PCR para los tres genes: 95°C por 10 minutos para activar la enzima, 95°C por 15 segundos y 53°C por 1 minuto para los 40 ciclos de PCR y un calentamiento gradual cada 0,1°C, desde 50 a 99°C para la curva de disociación (*melting*) (Figura 15).

La temperatura media aproximada para la amplificación de cada gen resultó ser:

TLR-3	: 52, 0 °C
TLR-4	: 51, 6 °C
TLR-9	: 50, 4 °C
GAPDH	: 54, 9 °C

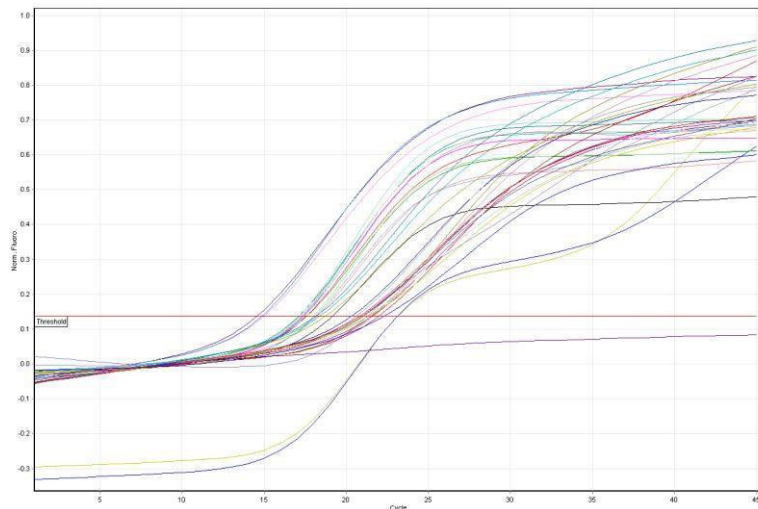


Figura 15. Expresión de mRNA de los genes TLR-3, TLR-4 y TLR-9 en macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* mediante qRT-PCR.

Los resultados se expresaron en valores de Ct (*threshold cycle*) por triplicado para cada tratamiento, el análisis de la cuantificación relativa se realizó usando el método comparativo de Ct o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ gen estudio} - Ct \text{ gen GAPDH}) - (Ct \text{ gen estudio} - Ct \text{ gen GAPDH})]$$

Grupo infectado

Grupo No infectado

Los resultados se interpretaron como la variación en los niveles de expresión del gen estudiado, relacionándolo al gen *housekeeping* (GAPDH) para cada tratamiento o grupo infectado respecto al control o grupo no tratado,

se realizó para cada tratamiento de cada gen en estudio (Schmittgen *et al.*, 2008; Livak *et al.*, 2001).

4.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS CITOQUINAS IL-12 Y TNF- α EN MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS INFECTADOS CON *Leishmania braziliensis*

Se utilizó con el mismo procedimiento detallado anteriormente para la extracción de RNA de los cultivos que resultaron positivos para la producción de óxido nítrico y la retrotranscripción de RNA a cDNA.

4.5.1 Selección de *primers* para IL-12 y TNF- α

Los *primers* utilizados para el estudio de expresión de mRNA de los genes IL-12 y TNF- α fueron seleccionados revisando fuentes bibliográficas (Moura *et al.*, 2013) donde fueron utilizados en modelos murinos de la línea Balb/c. Ambos genes se analizaron con el programa bioinformático *Oligoanalyzer* 3,1 y en el *GenBank*. Posteriormente los *primers* para IL-12 y TNF- α se sintetizaron en la casa comercial *Invitrogen Life Technologies*® a una concentración de 50nM (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencias de genes utilizados para la expresión de dos citoquinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α y el gen de referencia GAPDH.

Nombre del Gen	Secuencia de los primers (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Numero de acceso al GenBank	
IL-12	FW: CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG RV: CCGGAGTAATTTGGTGCTCCACAC	371	BC103608.1	4
TNF- α	FW: CCTCACACTCAGATGATCTTCTCA RV: TGGTTGTCTTTGAGATCCATGC	146	NM_013693	5
GAPDH	FW: TGCACCACCAACTGCTTAGC RV: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	258	NM_008084	2

Amplificación de cDNA de las citoquinas IL-12 y TNF- α en tiempo real

Previamente se realizó la retrotranscripción de mRNA a cDNA de los grupos de análisis, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (para TLR). La detección y cuantificación de la expresión genética de las dos citoquinas IL-12 y TNF- α se realizaron por triplicado para cada tratamiento utilizando los cDNA sintetizados, los cebadores específicos para cada gen, y el mismo kit de reacción *Master Mix Power SyBrGreen PCR* (marca *Applied Biosystem*) con los reactivos necesarios para la prueba, siguiendo las indicaciones del inserto el cual fue detallado anteriormente. La temperatura media aproximada para la amplificación de cada gen resultó ser: IL-12: 50,5 °C, TNF- α : 55,4 °C y GAPDH: 54,9 °C.

Para determinar la variación de la expresión del mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de las dos citoquinas en estudio, se utilizó la fórmula anteriormente descrita. Las muestras que presentaron un solo pico en la curva de disociación fueron consideradas (Figura 16).

V. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LA CEPA C234 DE *Leishmania braziliensis*

Los *primers* utilizados para tipificar la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* (LBF1 y LBR1) fueron analizados con el programa BLAST del *GenBank* disponible en la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank> y se observó que los alineamientos son específicos para secuencias de *Leishmania sp.* (Figura 17).

BLAST » **blastn suite** » RID-KTZEW8CU015 [Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

BLAST Results

ⓘ Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.
[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

Job title: LBF1

RID [KTZEW8CU015](#) (Expires on 07-06 01:03 am)

Query ID	Id Query_187923	Database Name	nr
Description	None	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.8.0+ Citation
Query Length	25		

Sequences producing significant alignments:
 Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Leishmania peruviana genome assembly Leishmania peruviana LEM-1537_V1, chromosome : 31	50.1	110	100%	8e-04	100%	LN609195.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 36	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	FR799010.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania panamensis strain 1166 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	AY366071.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/GF/2008/TD2008 clone TD2008.34 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700191.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/GF/2008/TD2008 clone TD2008.17 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700174.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/GF/2008/TD2008 clone TD2008.12 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700169.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/GF/2008/TD2008 clone TD2008.11 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700168.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/GF/2008/TD2008 clone TD2008.2 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700159.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/BR/78/M5378 clone M5378.43 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700156.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/BR/78/M5378 clone M5378.39 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700152.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/BR/78/M5378 clone M5378.22 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700135.1
<input type="checkbox"/>	Leishmania guyanensis strain MHOM/BR/78/M5378 clone M5378.10 minicircle kinetoplast, partial sequence	50.1	50.1	100%	8e-04	100%	KY700123.1

Figura 17. Resultado de los alineamientos de los *primers* para LBF1 mediante el algoritmo BLASTN usando patrones de secuencias de nucleótidos del *GenBank*. Se muestra alta homología para el género *Leishmania*. Se utilizó la herramienta bioinformática NCBI. URL: www.blast.ncbi.nlm.nih.gov

Los productos amplificados de los *primers* LBF1 y LBR1, mediante PCR convencional del DNA extraído de los promastigotes de *Leishmania braziliensis* fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5%. Se obtuvo un producto de amplificado de 536pb de peso molecular (Figura 18).

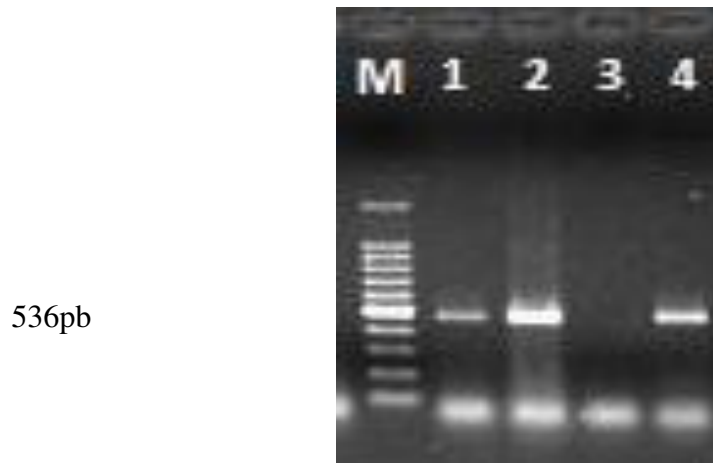


Figura 18. Productos amplificados de kDNA de promastigotes de la cepa C234 de *Leishmania braziliensis*, *Primer* LBF1/LRF1 de 536 pares de bases.

M: Marcador molecular de PCR marca (Sigma) de 100-1000 pb. **Carriles 1,2 y 4:** Productos de amplificación. **Carril 3:** Control negativo.

Las bandas de los productos amplificados obtenidos de la electroforesis se purificaron y posteriormente se desnaturalizaron y secuenciaron en el secuenciador ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer Applied Biosystems*. Se obtuvieron los electroferogramas definidos para cada primer (LBF1 y LBR1) de *Leishmania braziliensis*, las secuencias obtenidas fueron de 393 nucleótidos (Figura 19).

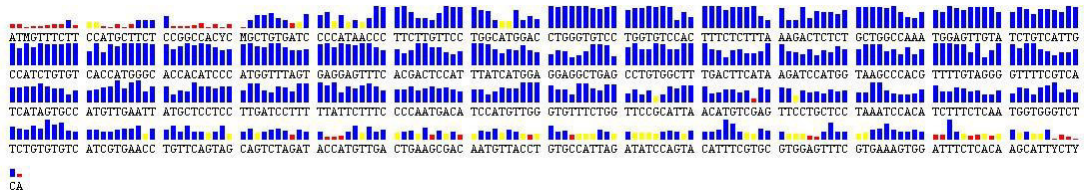


Figura 19. Electroferogramas obtenidos en el secuenciador automático *Abi Prism* a partir de los productos de PCR para el gen LBF1 de *Leishmania braziliensis*.

Todos los productos secuenciados fueron editados, alineados y comparados entre ellas a través del programa CLUSTAL X Y MEGA 5.10 y se obtuvo un producto de 393 nucleótidos, seguidamente se confrontaron con otras secuencias conocidas de diferentes especies de *Leishmania* reportadas en el *GenBank* a través del programa BLAST (Figura 20 y 22).

Se determinó mayor homología para *Leishmania (Viannia) braziliensis* de 98% y un valor de E de 0.0 (M87315.1) y para *Leishmania braziliensis* una homología de 96% con un valor de E de $1e-70$ (U19804.1), siendo estos valores altamente significativos (Figura 20). Así mismo se registró que para *Leishmania braziliensis* reconocía la secuencia parcial de minicírculos de ácido desoxirribonucleico de kinetoplasto (kDNA), siendo para este el *primer* utilizado (Figura 21).

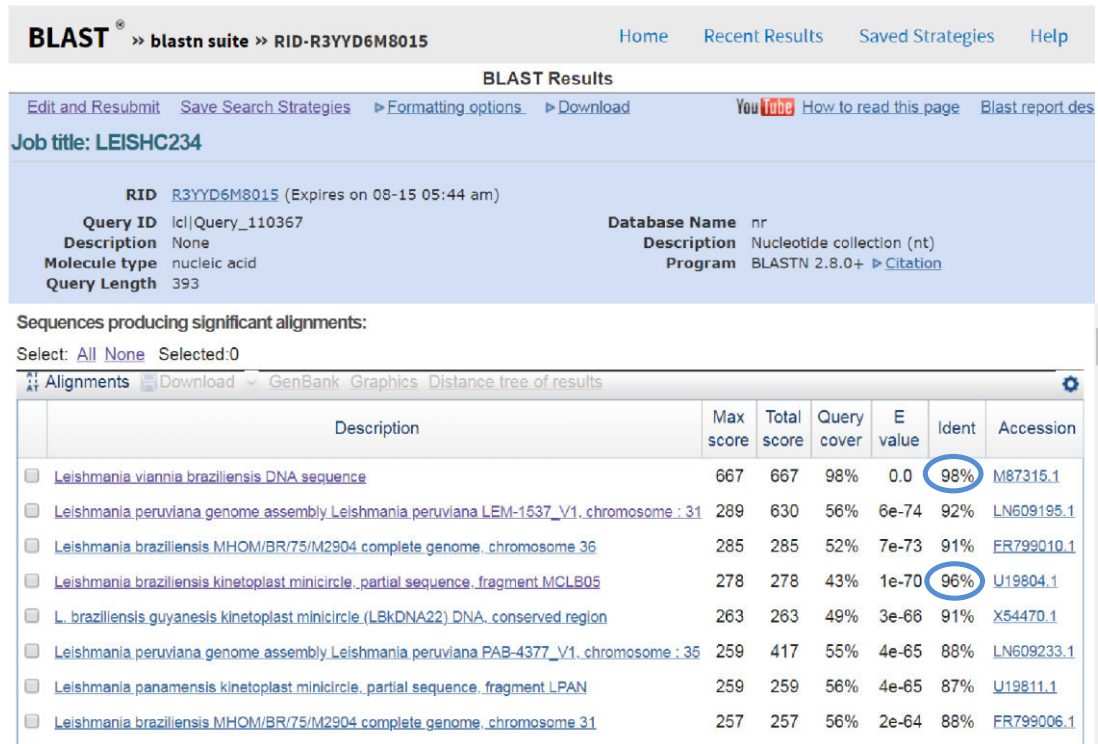


Figura 20. Resultado de los alineamientos del producto obtenido por secuenciamento para el *primer* LBF1 con el programa BLAST del *GenBank*.

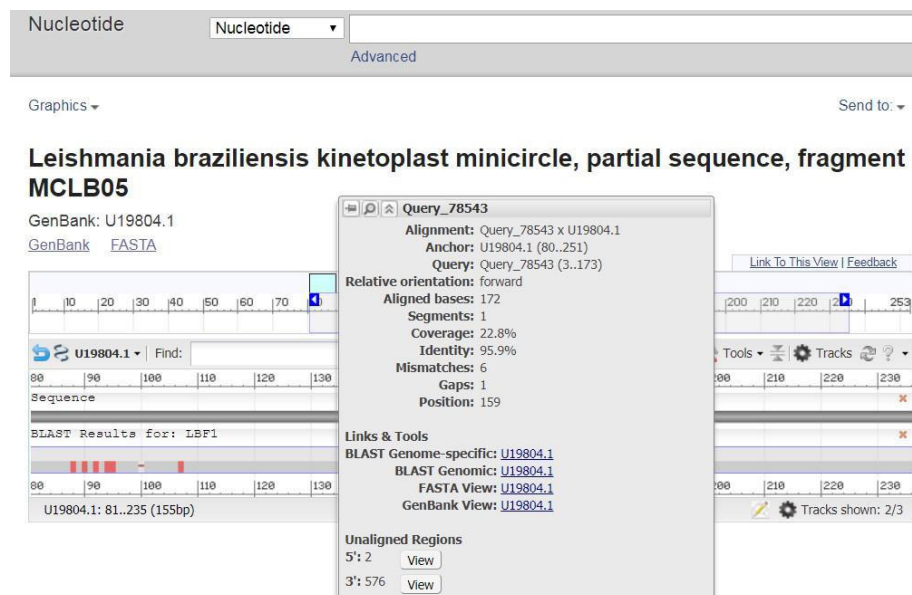


Figura 21. Analisis del producto secuenciado de LBF1 de los promastigotes de *Leishmania* en el programa BLAST del *GenBak* donde se muestra un porcentaje de identidad de 95.9% (~96%) con *Leishmania braziliensis*.

El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de la cepa C234 fueron hechas con secuencias de la base de datos del *GenBank* descritos en la Tabla 7, la comparación se realizó según las especies de *Leishmania* con más porcentaje de homología y que están distribuidas en América del Sur (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias nucleotídicas de *Leishmania* reportadas en el *genBank* utilizadas para el análisis filogenético.

Especie	País/Año de origen/ Cepa	Número de accesoión
<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904	U19803.1
<i>Leishmania braziliensis</i>	PERÚ, 2001	U19804.1
<i>Leishmania panamensis</i>	BRAZIL, 2001	U19811.1
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2904	M87315.1
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	MHOM/PE/76/SL5	M87317.1
<i>Leishmania peruviana</i>	MHOM/PE/87/PAB2880	MF278776.1
<i>Leishmania major</i>	MHOM/IR/00/PII2 2004	AY573187.1

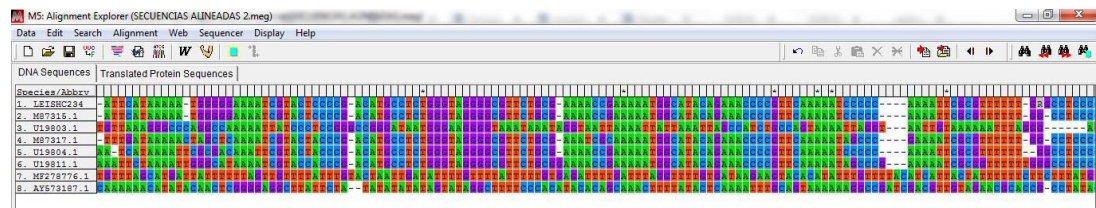


Figura 22. Comparación de la secuencia nucleotídica de la cepa C234 (LEISHC234) con las secuencias reportadas en el *GenBank* para *Leishmania*, analizadas mediante el programa MEGA 5.10.

Se realizó un análisis filogenético de la secuencia obtenida para la Cepa C234 de *Leishmania braziliensis* comparada con las secuencias reportadas en el *GenBank* (Tabla 7) y se observó la presencia de 4 clados definidos para el género *Leishmania* (Figura 23).



Figura 23. Árbol filogenético de la secuencia obtenida de la cepa C234 (LEISHC234) obtenidas por la técnica de Neighbor-Joining, con 1000 repeticiones. Se observa mayor homología con las especies *Leishmania braziliensis* y *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

5.2. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS CON LA CEPA C234 de *Leishmania braziliensis*

Mediante la metodología empleada se logró obtener macrófagos del peritoneo de ratones de línea Balb/c, se reconoció su morfología y sobrevivencia para luego poder diferenciarlos de los infectados y obtener una taza adecuada de población para el estudio, para ello se realizó recuentos para hallar la concentración, esta fue de $1,83 \times 10^5$ macrófagos/ml.

Al infectar los macrófagos peritoneales con promastigotes de *Leishmania*, se infectaron en una proporción 10:1 (parásitos/macrófago).

Después de la infección se observó que los promastigotes se adosaban alrededor de los macrófagos y algunos eran absorbidos o fagocitados por ellos formando vacuolas parasitóforas (Figura 24 y 25).

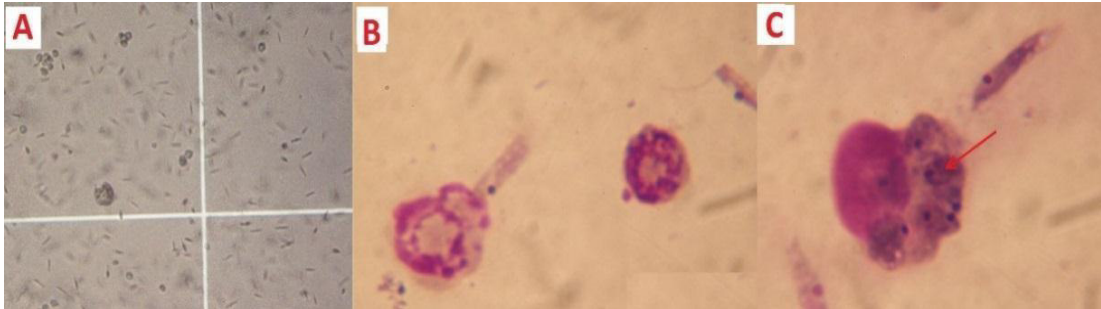


Figura 24. Macrófagos peritoneales murinos infectados con *Leishmania braziliensis*. **A:** Vista al microscopio de macrófagos expuestos a *Leishmania braziliensis* (40X). **B:** Macrófago fagocitando a *Leishmania braziliensis*, (100X). **C:** Macrófago infectado con amastigotes de *Leishmania braziliensis*, la flecha señala la vacuola parasitófora (100X).

El porcentaje de macrófagos peritoneales infectados a las 24 horas *in vitro* fue de un promedio de 13.38 y después de las 48 horas de infección fue de un promedio de 37.47; en macrófagos infectados a las 24 horas, el número promedio de amastigotes fue de aproximadamente de 3,1 y a las 48 horas de infección fue de 5,3 (Tabla 8).

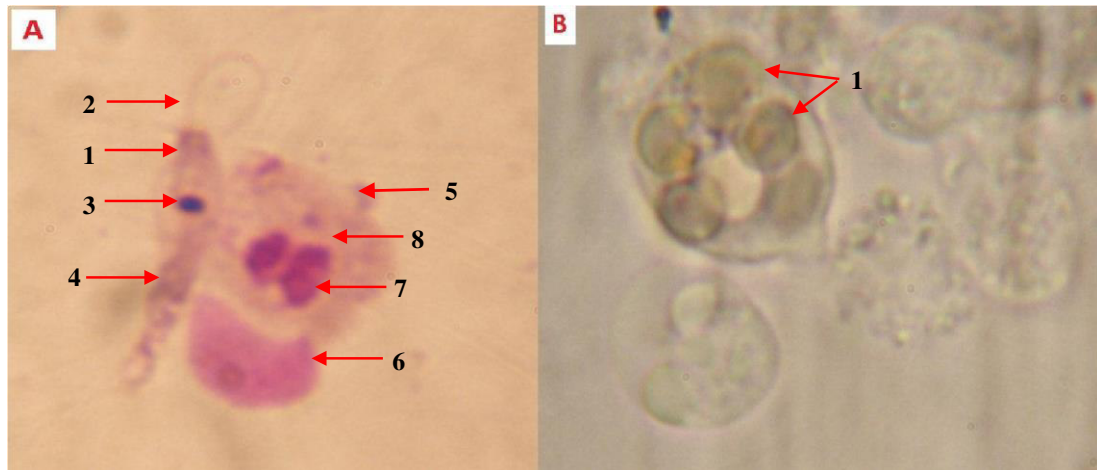


Figura 25. Formación de vacuolas parasitóforas en macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* (100X).

A: Parásito de *Leishmania* (promastigote) y macrófago infectado (24hrs); 1: Promastigote, 2: Flagelo libre, 3: kinetoplasto, 4: Núcleo, 5: Macrófago, 6: Núcleo, 7: Vacuola parasitófora (fagolisosoma), 8: Amastigotes. **B:** Macrófago infectado con amastigotes de *Leishmania braziliensis* (48hrs); 1: Vacuolas parasitóforas.

Aplicando la fórmula para determinar la capacidad infectiva, se halló un valor promedio de 40.14 y 187.38 a las 24 horas y 48 horas respectivamente, la diferencia entre estos valores determinó un incremento de la capacidad infectiva de 4.68 entre las 24 y 48 horas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.00011$). Los detalles se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis* en macrófagos murinos.

	24 horas	48 horas
% de Infectados	13.38	37.47
Promedio de infectados	26.15±7.25	72.23±20.02
Promedio de amastigotes por macrófago	3,1±0.1	5,3±0.3
Capacidad infectiva	40.14	187.38

	--	4.68
Incremento con respecto a 24 horas		

5.3 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CULTIVOS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS INFECTADOS CON *Leishmania braziliensis*

La producción de óxido nítrico (ON) se midió en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos murinos infectados y no infectados a través de la acumulación de nitritos. Después del período de incubación se cuantificó los niveles de nitritos a las 0, 2, 12, 15, 24 y 48 horas. Se realizaron tratamientos por triplicado y se obtuvo la medición de ON mediante la detección de la absorbancia a través de un lector de ELISA (Anexo 1, Tabla 9).

Como estándar se empleó el nitrito de sodio y una curva elaborada en base a distintas concentraciones del mismo (Figura 26). Se halló la siguiente ecuación de la curva lineal:

$$Y = 0.0702 + 0.0193 (X) \text{ Donde:}$$

Y= Absorbancia

X= Concentración ON

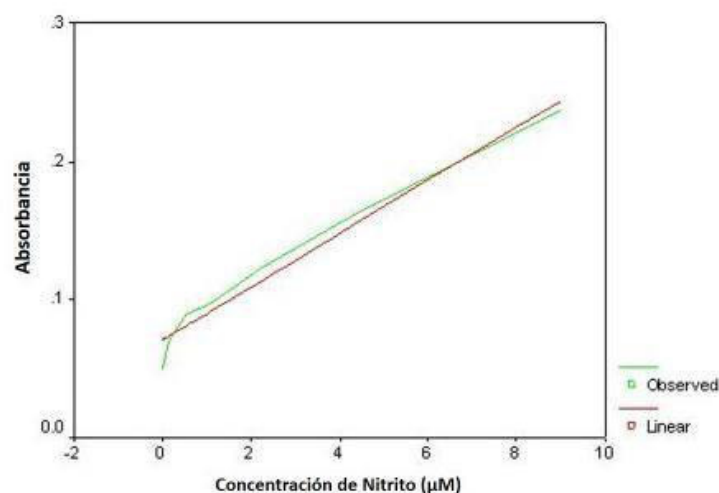


Figura 26. Curva estándar con los valores de absorbancia para producción de óxido nítrico.

En el estudio se registró la producción de óxido nítrico a partir de las 2 horas después de la infección, tanto en el grupo infectado con un valor medio de 1.54 y en el grupo no infectado con un valor medio de 2.53; la diferencia entre ambos grupos fue significativa ($p= 0.0005$). Sin embargo, en las siguientes horas se observó que, en el grupo infectado, la producción de óxido nítrico empezó a descender a diferencia del grupo no infectado. Entre las 12, 15 y 24 horas después de la infección, el grupo infectado no registró un incremento significativo entre sus valores en la producción de óxido nítrico, a las 48 horas se observó un ligero incremento (2.37) al casi doble de expresión respecto a las 24 horas, y comparado con el grupo no infectado (13.68) fue notoria la diferencia siendo mayor producción de ON en el grupo no infectado, esta diferencia fue altamente significativa, ($p= 0.0001$). Según los resultados a las 48 horas se observó mayor producción de ON en el grupo de macrófagos murinos no infectados, el grupo infectado mostró una diferencia de 82.7% con respecto al grupo no infectado (Figura 27).

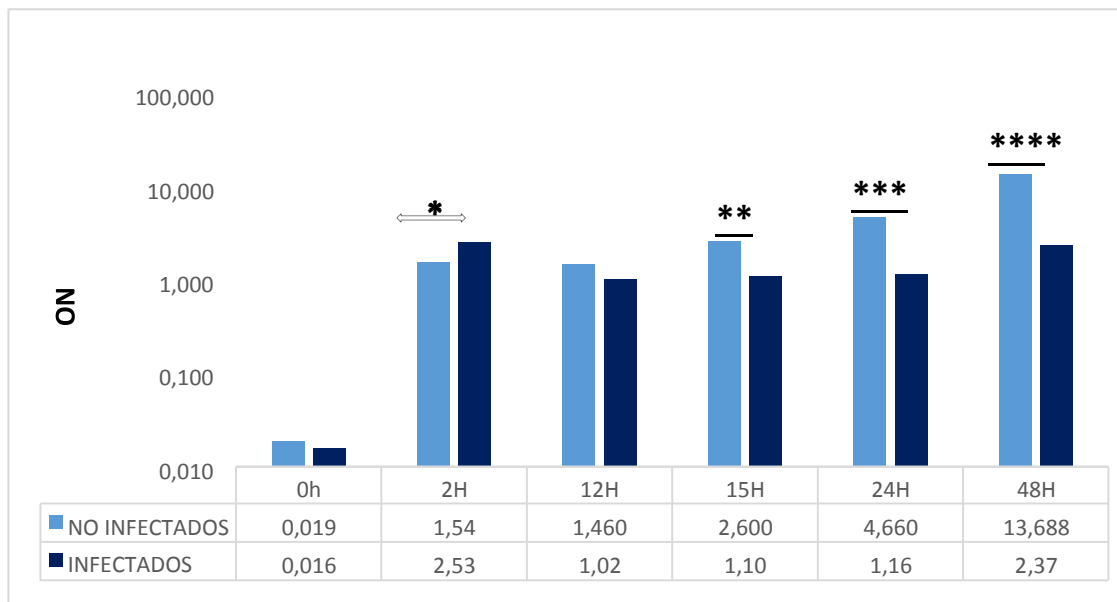


Figura 27. Cuantificación de óxido nítrico en cultivos de macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis*. Se aplicó la prueba t – Student para muestras independientes.

* $p= 0.0005$, ** $p= 0.015$, *** $p= 0.004$, y **** $p= 0.0001$ cuando son comparados con el grupo no infectado.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES TLR-3, TLR-4 Y TLR-9 EN MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS INFECTADOS CON *Leishmania*

braziliensis

En los tratamientos se detectó la expresión génica transcripcional en tres tipos de TLR, tanto en los grupos infectados y grupos no infectados, realizándose el estudio por triplicado. Los valores para la detección de la expresión fueron calculados mediante la técnica Delta-Delta Ct a través de software de *Applied Biosystems* aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Según el programa, indica la cantidad de veces que se sobre expresa cada gen de estudio con respecto al normalizador (GADPH), siendo el mismo gen analizado en los tratamientos y control. Por lo tanto, se considera que valores iguales a uno indicaran una misma expresión entre el gen de estudio y el calibrador, cuando el valor es menor a uno indica que el gen de estudio se expresó menos que el calibrador y cuando es mayor a uno, indican que el gen de estudio se expresó más que el calibrador.

En el estudio se registró expresión génica de mRNA en los tres genes analizados, TLR-3, TLR-4 y TLR-9 tanto en el grupo de macrófagos murinos no infectado como en el infectado con *Leishmania* a las 24 horas.

El gen TLR-3 registró 5.117 veces más expresión génica que el grupo no infectado (control) siendo esta diferencia altamente significativa ($p= 0.000045$). El grupo no infectado con *Leishmania* registró un valor menor de expresión (0.74) con respecto al gen calibrador (GADPH).

El gen TLR-4 expresó 3.23 veces más mRNA en el grupo infectado con *Leishmania* que el gen calibrador y esta diferencia también fue significativa

($p= 0.0004$), los valores del grupo no infectado fueron casi semejantes al gen calibrador (0.91).

El gen TLR-9 se expresó 3.95 veces más en el grupo infectado con una significancia de $p= 0.00001$ con respecto al gen calibrador GAPDH y el grupo no infectado presentó una expresión muy similar al calibrador (0.92) (Figura 28).

Al hacer la comparación de la expresión génica entre los tres genes estudiados (TLR-3, TLR-4 y TLR-9), TLR-3 fue el que presentó mayor expresión de mRNA en el grupo infectado con *Leishmania braziliensis*, detectándose que existe diferencia significativa al comparar los valores de expresión génica de TLR-3 y TLR-4 ($p= 0.00000033$); así mismo, existe diferencia significativa entre los valores expresados para TLR-3 y TLR-9 ($p= 0.04$), pero no se halló diferencia significativa al comparar la expresión génica entre TLR-4 y TLR-9 ($p= 0.12$). Los resultados se detallan en la Figura 28.

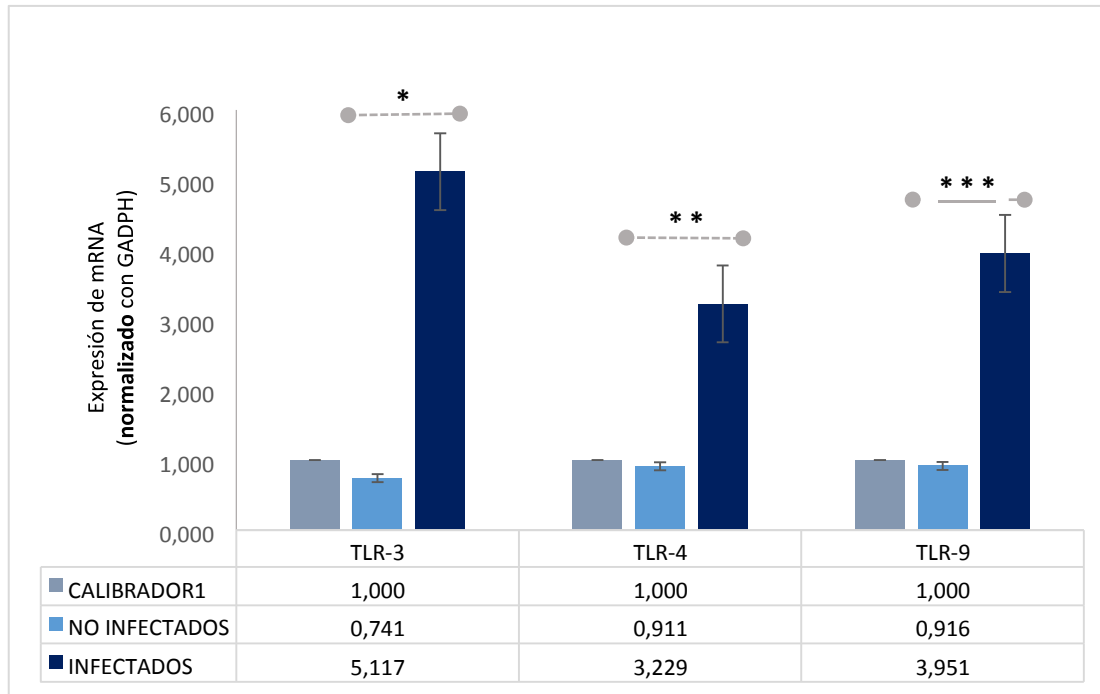


Figura 28. Cuantificación relativa del mRNA de TLR-3, TLR-4 y TLR-9 en cultivo de macrófagos murinos infectados y no infectados con *Leishmania braziliensis* respecto al calibrador. Se aplicó la prueba t-Student para muestras independientes.

* $p= 0.00005$, ** $p= 0.0004$, *** $p= 0.00001$, cuando son comparados con el grupo no infectado.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS CITOQUINAS IL-12 Y TNF- α EN MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS INFECTADOS CON *Leishmania braziliensis*

La expresión genética de mRNA para IL-12 y TNF- α se cuantificó según el valor de ΔCT el cual fue normalizado en base al control endógeno o gen *housekeeping* (GAPDH) y fueron comparadas con el grupo no infectado. Los resultados fueron expresados como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

En el estudio se detectó expresión génica de mRNA para ambos genes de citoquinas, la expresión genética de IL-12 en macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* registró 4.18 veces más expresión con respecto al grupo no infectado, siendo esta diferencia altamente significativa ($p= 0.0009$).

Así mismo los resultados obtenidos para TNF- α también presentaron un incremento en la expresión con respecto al grupo no infectado siendo esta diferencia de 3.68 veces más de expresión de mRNA en el grupo infectado con *Leishmania braziliensis* con respecto al grupo no infectado, resultando este valor estadísticamente significativo ($p= 0.00003$) (Figura 29).

Al hacer el análisis comparativo de expresión génica entre ambos genes, se registró que no existe diferencia significativa en los valores de expresión genética de las citoquinas IL-12 y TNF- α en el grupo infectado con *Leishmania braziliensis*.

Sin embargo, el análisis comparativo de la expresión de TLRs (TLR-3, TLR-4 y TLR-9), citoquinas (IL-12 y TNF- α) y óxido nítrico en los cultivos de macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* y no infectados si registró diferencia significativa (Anexo 2, Tabla 10).

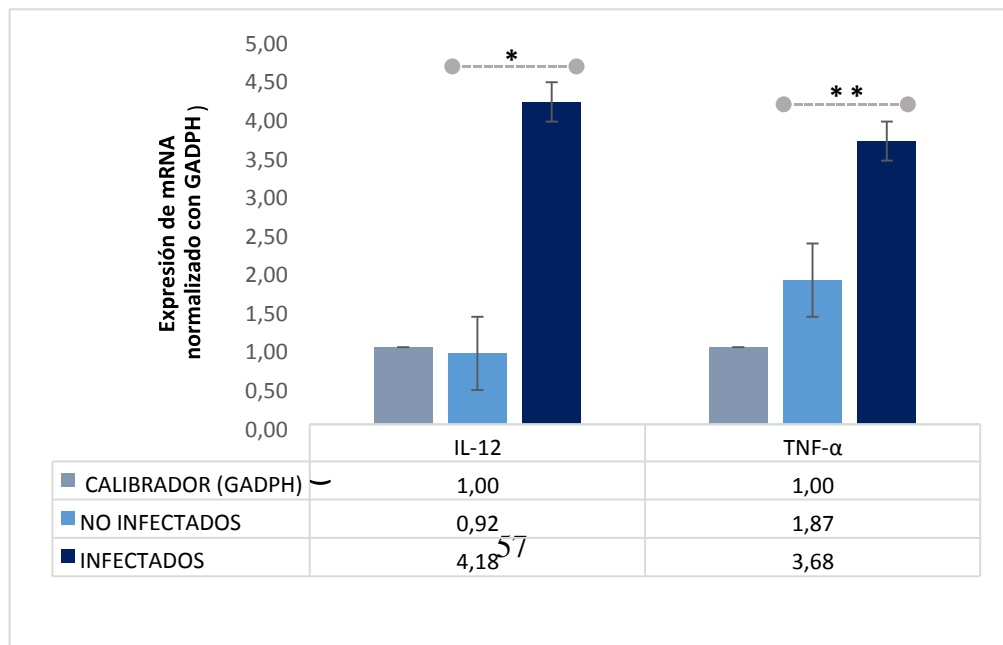


FIGURA 29. Cuantificación de los niveles de mRNA para las citoquinas IL-12 y TNF- α en cultivos de macrófagos murinos infectados y no infectados con *Leishmania braziliensis* respecto al calibrador. Se aplicó la prueba t-Student para muestras independientes.

* $p= 0.0009$ y ** $p= 0.00003$, cuando son comparados con el grupo no infectado.

VI. DISCUSIÓN

La leishmaniasis es causada por diversos tipos de *Leishmania* que puede producir cuadros clínicos severos y desfigurantes, el 97.5% de los casos reportados son del tipo leishmaniasis cutánea, siendo 6037 casos reportados al 2017 y en el año 2018 hasta la semana 14 se detectaron 985 casos siendo Cusco el departamento con mayor incidencia. El 35.59% de los casos se reportaron en el grupo adulto (30-59 años), mayoritariamente en el género masculino (Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades MINSA, 2018).

Algunas especies de *Leishmania* se han relacionado con manifestaciones clínicas específicas, en el caso de *Leishmania braziliensis* que se presenta como leishmaniasis cutánea, según Cantanhede, (2015). El 2001, Andersen, *et al.*, ya reportaban que la mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea en el Perú eran causados por *Leishmania braziliensis* y ocasionalmente por *Leishmania peruviana*, datos corroborados también por otros autores (Hiroto, 2010 y Urbano, 2011). Según reportes de Sandoval (2016) y MINSA (2018), esta especie se encuentra distribuida en las regiones Sierra y Selva como: Huánuco, Cusco, San Martín y Madre de Dios.

La cepa C234 de *Leishmania braziliensis*, corresponde a un aislado de exudado de un paciente con leishmaniasis tipo cutáneo y que al momento de la donación de encontraba en el pasaje o repique número 234. El análisis genético de las secuencias de la cepa C234 indica que la muestra corresponde a la especie *Leishmania* y representa un porcentaje de homología del 96% con secuencias reportadas para *Leishmania braziliensis* en el *Genbak* (U19804.1).

El análisis filogenético de las secuencias analizadas de la cepa C234 de *Leishmania* mostraron alta similitud con las secuencias reportadas en el *Genbank* tanto para *Leishmania (Viannia) braziliensis* como para *Leishmania braziliensis*, confirmando que la cepa C234 estudiada corresponde a la especie de *Leishmania braziliensis*. Esta especie ha sido reportada en Perú por diversos autores (Romero *et al.*, 1987; Odiwuor *et al.*, 2002; CalvaySánchez *et al.*, 2015) y el MINSA que informó que *Leishmania braziliensis* se encuentra circulando en Cusco, Huánuco, Madre de Dios y Loreto (Lucas *et al.*, 1998; MINSA, 2017). Así mismo son los departamentos en los que se ha reportado mayor incidencia de casos de leishmaniasis cutánea (Urbano, 2011).

Los macrófagos constituyen parte del sistema de defensa inmune celular frente a patógenos externos como *Leishmania* y desempeñan un rol importante durante el proceso de infección. La determinación de la especie de *Leishmania* es importante porque existen diferencias en la expresión génica de los receptores tipo *toll* y citoquinas en macrófagos relacionadas con la especie (Adachi *et al.*, 2001; Hernandez y Becker, 2007; Leite *et al.*, 2012). Estas células se encargan de la fagocitosis y la eliminación del parásito a través de la formación de vacuolas fagocitóforas para después secretar enzimas y citoquinas con el fin de defender al organismo. Aunque también pueden ser células hospederas del mismo (Liese *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se infectaron macrófagos extraídos del peritoneo de ratones Balb/c con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* a una proporción de 1:10 macrófago: parásitos, la infección se incrementó al 53.5% entre las 24 y 48 horas después de la infección ($p < 0.00011$) lo que indica el alto grado de capacidad infectiva de la cepa. Kweider *et al.* (1987) analizaron infectividad de *Leishmania (V.) braziliensis* en macrófagos peritoneales de ratón, inocularon la proporción de diez parásitos por macrófago y reportaron mayor porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania* a las 48 horas, y determinaron mayor capacidad infectiva en fase estacionaria a diferencia de la fase exponencial, estos resultados coincidirían con los obtenidos ya que se observó mayor porcentaje de infección a las 48 horas (37.5) (Tabla 8), donde posiblemente el parásito se multiplica para después iniciar la fase estacionaria. Estos resultados también se ven corroborados con los estudios de Calvay-Sánchez *et al.* (2015) quienes determinaron el crecimiento exponencial de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana* dentro de las 24 horas de infección.

Jara *et al.* (2017) estudiaron la capacidad proliferativa de *Leishmania braziliensis* *in vitro* y determinaron que el porcentaje de infección en células fagocíticas en el quinto día era aproximadamente $73.9 \pm 4.5\%$ y el número promedio de amastigotes intracelulares por macrófago era de 3.4 ± 0.2 . En el presente trabajo se encontró que el porcentaje de infección a los dos días fue de 37.47% y el número promedio de amastigotes por macrófago fue de 5.3 ± 0.3 , demostrando una alta capacidad infectiva de la cepa C234 de *Leishmania braziliensis*.

El incremento del tamaño del fagosoma o vacuola parasitófora estaría relacionado con un incremento de la población del parásito (Niño y Camacho, 2005; Rojas, 2010). Este incremento de la población sugiere que los parásitos encuentran condiciones favorables para seguir dividiéndose, según Duclos *et al.* (2000) sostienen que mientras más grande es el fagosoma la supervivencia del parásito es mayor ya que se reduce la probabilidad de acumular enzimas

y radicales importantes lo que aventajaría la permanencia del parásito por lo cual la interacción *Leishmania* y macrófago resulta crítica. Estudios *in vitro* de *Leishmania amazonensis* también ponen en evidencia que la tasa de replicación se asocia con el volumen del fagosoma, por lo que sugieren que, a mayor volumen, mayor tasa de replicación (Heredia, 2015).

Así mismo, Chacón (2010) determinó que existe una semejanza en el tamaño de las vacuolas de macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* a las 72 horas y *L. amazonensis* a las 24 horas post infección, estos resultados sugieren que las VP van creciendo durante la infección y la cantidad de parásitos se incrementa a consecuencia de la replicación. En los macrófagos peritoneales murinos infectados con *Leishmania braziliensis* del presente estudio se observó más de una VP por macrófago (aproximadamente 2 a 3), lo cual indica que los parásitos se estarían replicando en vacuolas individuales, similares resultados reportaron Niño *et al.* (2003).

Frente a la infección de los macrófagos murinos por *Leishmania*, en la respuesta inmune participan macrófagos estimulados por IFN- γ y TNF- α activándose la vía iNOS, que conduce a la liberación de ON. El ON tiene potentes efectos antimicrobianos que ocasionan la muerte de parásitos intracelulares. Sin embargo, diferentes cepas de *Leishmania* exhiben diversas susceptibilidades al ON producido por los macrófagos (Leite *et al.*, 2012).

En la investigación del presente trabajo se determinó que en los tratamientos de macrófagos infectados con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis*, la mayor producción de ON se presentó a las 2 horas post infección, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0005$) al ser comparados con el grupo de macrófagos no infectados, estos valores fueron disminuyendo en el tiempo, siendo a las 15 horas menor que en el grupo no infectado, a las 24 horas los niveles de ON disminuyeron notablemente ($p=0.003$) en relación a los cultivos no infectados y a las 48 horas está

diferencia se hizo aún más notoria ($p=0.0001$) indicando que el parásito podría estar inhibiendo la producción de ON (Figura 27). Estos datos coinciden con los obtenidos por Holzmüller *et al.* (2005) con *Leishmania infantum* quienes verificaron la resistencia del parásito a la producción de ON generada por apoptosis ocasionada por los antimoniales que reciben como parte del tratamiento. Por otra parte, existen estudios que demuestran que las cepas de *Leishmania* generan resistencia hacia ON, esto se ha determinado en el estudio de Giudice *et al.* (2007) quienes reportaron como cepas óxido nítrico-resistentes a *Leishmania (L.) amazonensis* y *Leishmania (V.) braziliensis* en un estudio realizado en pacientes infectados. Estos hallazgos explicarían que los cultivos de macrófagos expuestos a *Leishmania braziliensis* producen muy poco ON lo cual se relacionaría con el incremento de la población de amastigotes dentro de los macrófagos. Es así que en el presente estudio se observó una diferencia de 82.7% de producción de ON entre el grupo de macrófagos no infectados con respecto a los infectados a las 48 horas posteriores a la infección.

En otros estudios realizados para *Leishmania amazonensis* y *Leishmania major* la producción de ON se redujo en 63% y 99%, respectivamente (Camargo, 2000). Maksouri *et al.* (2017) estudiaron macrófagos murinos infectados con *Leishmania trópica* y observaron la disminución en la producción de óxido nítrico y el incremento de promastigotes a nivel intracelular, relacionando este hecho a algunas citoquinas proinflamatorias producidas por los macrófagos que cambian el metabolismo de L-arginina hacia la producción de L-ornitina y urea a través de la activación de la vía arginasa lo que conllevaría a una disminución en la producción de ON. Estos reportes estarían corroborando los datos obtenidos en el presente estudio, en el que se registró la disminución en la producción de óxido nítrico en el grupo infectado con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis*. Así mismo, hay una relación entre la producción de ON y la expresión del gen TLR-4, estudios anteriores han determinado que se requiere la expresión de TLR-4 para la síntesis de ON y el control de *Leishmania* (Kropf *et al.*, 2004; Murray

et al., 2013; Mukherjee *et al.*, 2012; Tolouei *et al.*, 2013). En el estudio se determinó que la expresión de mRNA de TLR-4 fue menor con respecto a TLR-3 y TLR-9, lo que se relaciona con la disminución considerable de la producción de ON en el grupo de macrófagos infectados, por lo que sugeriría que hay una relación directa entre la expresión de TLR-4 y ON en macrófagos infectados con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis*.

Con respecto a la expresión génica del gen TLR-4 en el estudio, se observó en el grupo infectado con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* fue mayor con respecto al grupo no infectado, siendo esta diferencia significativa ($p= 0.0004$), sin embargo, comparado con la expresión de los genes TLR-3 y TLR-9, el gen TLR-4 fue menor. En estudios realizados por Kropf *et al.* (2004) determinaron que la ausencia de TLR-4 incrementa el número de lesiones cutáneas con *Leishmania major* y concluyeron que el control de la leishmaniasis es dependiente de TLR-4 y de IL-12 para esta especie, también plantearon que se requiere TLR-4 para el control eficaz del parásito, probablemente debido a la actividad de la vía iNOS.

Así mismo, Schleicher *et al.* (2016) indicaron que en ausencia de TNF- α hubo una mayor expresión de arginasa-1 lo que produjo una disminución de producción de óxido nítrico posiblemente debido a la competencia entre las dos enzimas iNOS y Arginasa-1, que agotaron su sustrato común L-arginina. En el estudio la expresión del gen de la citoquina TNF- α fue menor al de IL-12, lo cual podría explicar la disminución de la producción de ON en el grupo infectado.

Estudios en *Leishmania major*, determinaron que los parásitos son susceptibles a la producción de ON donde IFN- γ producida por las células Th1 activan y estimulan a macrófagos parasitados para que produzcan óxido nítrico a través de la inducción de iNOS, produciendo la muerte del parásito;

sin embargo, en parásitos de *Leishmania braziliensis* se ha determinado que estos son menos susceptibles a la producción de ON (Weinkoff *et al.*, 2013).

Los TLR's juegan un papel fundamental en la detección de patógenos microbianos lo cual ha dado lugar a una apreciación renovada de la inmunidad innata. La primera interacción del hospedero con *Leishmania* se da mediante los TLRs. Estos TLRs, excepto TLR-3, van a señalar mediante MyD88 que es una proteína adaptadora que va a transmitir señales de alerta al sistema inmune (Ve *et al.*, 2017).

En el trabajo se observó la expresión génica de TLR-3 inducida por la infección con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* y resultó ser altamente significativa con respecto al grupo no infectado ($p=0.00005$) estableciéndose una correlación entre la infección por el parásito, mayor cantidad de mRNA para TLR-3 y menor producción de óxido nítrico.

Al respecto, Flandin *et al.* (2006) demostraron que TLR-3 contribuye con el reconocimiento de *Leishmania* empleando *L. donovani* también demostraron que el IFN- γ influye en la mayor expresión de TLR-3. El silenciamiento de la expresión de TLR-3, TLR-2, IRAK-1 y MyD88 está relacionado con la secreción de ON y TNF- α inducida por promastigotes infectados con *L. donovani*. Prakash *et al.* (2015) determinaron que la expresión de TLR-1, TLR-2 y TLR-3 es modulada por el gen TLR-9, en macrófagos infectados con *L. major*.

Así mismo, Tolouei *et al.* (2013) investigaron la expresión de TLR-2 y TLR-4 en pacientes con leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania major* y reportaron que la expresión génica de TLR-2 y TLR-4 en macrófagos de los pacientes con forma de lesión curativa fueron significativamente más altos que los de pacientes con forma de lesión no curativa.

En ausencia de TLR-4, la actividad de la arginasa aumenta la formación de urea y reduce la formación de ON (Antoniuzzi *et al.*, 2004; Gatto *et al.*, 2015). Un estudio con ratones con una mutación en el gen TLR-4 no fue capaz de curar lesiones cutáneas de *Leishmania* (Muller *et al.*, 1997; Poltorak *et al.*, 2000). Estos resultados fueron confirmados posteriormente por el mismo grupo, utilizando un modelo experimental que fue sensible a la IL-12 (Kropf *et al.*, 2004). En el estudio se observó que la expresión génica de TLR-4, si bien es mayor en el grupo infectado con *Leishmania braziliensis*, resultó ser menor que la expresión génica de TLR-3 y TLR-9, lo cual, según el antecedente descrito anteriormente, explicaría la baja producción de ON en los grupos infectados.

El TLR-9 es un receptor localizado en el retículo endoplásmico y detecta motivos CpG presentes en el DNA no metilado de microorganismos (Latz *et al.*, 2004). En los macrófagos, el TLR-9 se une a su ligando desencadenando la producción de ciertas citoquinas proinflamatorias mediante la translocación al núcleo de NF- κ B, dependiente de MyD88 (Li *et al.*, 2017).

Martinez *et al.* (2008) analizaron en *Leishmania mexicana*, a su DNA conteniendo motivos CpG sin metilar que son reconocidos por el gen TLR-9 de macrófagos de médula ósea en ratones y encontraron que el DNA de *Leishmania* es un ligando que puede provocar un incremento de la expresión de mRNA de TLR-9, así mismo estimular la producción de citoquinas proinflamatorias IL-12p40 y TNF- α que ayudan al estímulo de la respuesta celular tipo Th1. Por lo tanto, sugieren que TLR-9 podría ser utilizado para diseñar terapias de prevención y curación de la leishmaniasis.

En este estudio se encontró que existe sobreexpresión de TLR-9 en el grupo de macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis*, siendo significativa la diferencia con el grupo no infectado ($p=0.003$), estos resultados

se ven corroborados por estudios anteriores. Lo cual indicaría que *Leishmania braziliensis* también induce la expresión de TLR-9 en macrófagos murinos *in vitro*. Así mismo TLR-9 estaría relacionado al control de la expansión de la infección, estudios previos han demostrado que en ratones deficientes de TLR-9 las infecciones provocadas por *L. braziliensis* registraban un incremento transitorio respecto al tamaño de las lesiones y en la carga parasitaria (Weinkopff *et al.*, 2013).

Estudios en células dendríticas infectadas con *Leishmania major* determinaron que la activación de estas células son dependientes de la producción de TLR-9, siendo necesario para la resistencia a la infección (Carvalho *et al.*, 2012).

En el presente estudio se registró que este incremento de expresión de mRNA de TLR-9 en el grupo de infectados con *Leishmania* se produjo a las 24 horas de enfrentamiento, diversos estudios determinan que la expresión de TLR-9 juega un papel importante en los inicios de la infección para conferirle resistencia y control al hospedero frente a *Leishmania braziliensis*, este mecanismo estaría mediado por IFN- γ (Weinkopff *et al.*, 2013). Así mismo, estudios realizados por Prakash *et al.* (2015) sugieren que la deficiencia de TLR-9 reduce la expresión de los genes TLR-1, TLR-2 y TLR-3 pero no de TLR-7 y de las citoquinas IL-12 y TNF- α en macrófagos tratados con promastigotes de *L. major*, concluyendo que TLR-9 modula la expresión de dichos genes. Los resultados del presente estudio demuestran que hay un aumento en los niveles de mRNA para los genes TLR-3 y TLR-9 de los grupos infectados con *Leishmania braziliensis*, lo que indicaría la relación entre ambos genes y que TLR-9 podría estar modulando la expresión de TLR-3 y este a su vez la expresión de la citoquina IL-12.

IL-12 es una citoquina proinflamatoria muy importante en la respuesta inmune contra *Leishmania*. Se considera que TLR-9 activa a los linfocitos Th1

para la secreción de IL-12. En células dendríticas dérmicas infectadas con *L. major*, se observó que activan y estimulan a los linfocitos T mediante la secreción de cantidades grandes de IL-12 para generar una respuesta tipo Th1. Así mismo, también participan las citoquinas IL-1, IL-23 e IL-27. De esta manera se activan y proliferan los linfocitos Th1 y Tc1 (Von, 2007).

En el presente estudio se reportó que la expresión génica de la citoquina IL-12 en macrófagos de ratones infectados con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* fue significativamente mayor respecto al grupo de macrófagos de ratones no infectados ($p=0.0009$).

Li *et al.* (2004) demostraron la producción de citoquinas proinflamatorias, especialmente IL-12 vía TLR-9 en ratones infectados con *L. major*. Así mismo, Schleicher *et al.* (2007) reportó que TLR-9 sólo está presente en plasmocitos y linfocitos B al estudiar leishmaniasis visceral producidas por *L. infantum*, y determinaron que la activación de TLR-9 es esencial para la producción de IL-12 en células dendríticas.

En *Leishmania braziliensis* también se demostró que es capaz de activar a las células dendríticas para producir IL-12 y TNF- α (Vargas *et al.*, 2008). De manera similar en el presente estudio se observó que IL-12 fue la citoquina que presentó mayor expresión génica que TNF- α en el grupo de macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* y que a su vez junto con TLR-9 presentaron altas expresiones de mRNA. Conforme a los antecedentes descritos anteriormente podríamos inferir que la expresión de IL-12 y TLR-9 están relacionadas, como lo reportaron otros estudios en *Leishmania braziliensis* que señalan la producción de IL-12 en células dendríticas y que esta sería dependiente de TLR-9 (Schleicher *et al.*, 2007; Abou *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012); sin embargo Weinkopff *et al.* (2013) determinaron que producción de IL-12p40 no es dependiente de la expresión de TLR-9 en

infecciones con *Leishmania braziliensis*, así como para las citoquinas IL-10 e IL-4.

Autores como Flohe *et al.* (1998) y Ferlin *et al.* (1998), estudiaron la expresión de IL-12 en *L. major* *in vitro* en células epidérmicas como *in vivo* en ratones Balb/c, respectivamente y reportaron que existe incremento en la expresión de esta citoquina actuaría como un mediador induciendo la respuesta inmune protectora contra la infección. Estudios sugieren que IL-12 cumple un rol fundamental en la estimulación de linfocitos T para producir IFN- γ que posteriormente activa a las células fagocíticas para incrementar la capacidad microbiciada (Olivier *et al.*, 2005).

En el estudio se registró este incremento de expresión de IL-12 a las 24 horas post infección, otros autores (Reiner *et al.*, 1994; Carrera *et al.*, 1996; Meng-Lowell, 1997; Mosser-Zhang, 2010) analizaron expresión de mRNA hasta las 24 horas, y observaron picos de activación en células fagocíticas peritoneales y células de médula ósea de ratón a partir de las 6 horas de infección.

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria importante para el control intracelular de infecciones con *Leishmania* (Liew *et al.*, 1990), es una proteína producida principalmente por los macrófagos, que actúa en procesos inflamatorios, frente a enfermedades infecciosas (Roach *et al.*, 2002). Frente a la infección con *Leishmania braziliensis* la célula hospedera se vuelve más resistente debido a TNF- α e IFN- γ secretados por las células Th1 (De Souza-Neto *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se registró que existe expresión genética de TNF- α en macrófagos peritoneales murinos infectados con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis*. Estudios en diferentes especies de *Leishmania* han

reportado expresión de TNF- α (Satoskar, *et al.*, 1995; Ota *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2017).

Así mismo, se observó que la expresión de mRNA de TNF- α en el grupo infectado fue significativo con respecto al grupo no infectado ($p=0.00003$). Estos resultados se ven corroborados con los reportados por Hu *et al.* (2018) quienes demostraron que en ausencia de TNF- α , una infección con *Leishmania major* puede diseminarse rápidamente en el hígado lo que indicaría un rol principal de TNF- α en la activación inflamatoria de los macrófagos a través de la activación de IL-6.

Además, diversos estudios han demostrado que el TNF- α sinergiza con otras citoquinas para potenciar su acción protectora. Ota *et al.* (2008) determinaron que la activación de la vía iNOS es debido a que TNF- α e IL-12 actúan en conjunto con IFN- γ . Los linfocitos Tc1 participan mediante dos mecanismos: los linfocitos citotóxicos poseen mecanismos que actúan directamente sobre la expresión de TNF- α e IFN- γ en macrófagos para favorecer la disminución de *Leishmania*. Los linfocitos Tc causan lisis en los macrófagos infectados mediante la vía enzimática de perforina/granzima (Hernández-Ruiz, 2006).

De acuerdo a los resultados del estudio se podría inferir que TNF- α estaría actuando en conjunto con IL-12, ya que al analizar la expresión de ambos en el grupo de macrófagos infectado con *Leishmania braziliensis*, no se registró diferencia significativa, ambos se expresan en valores similares.

Así mismo, TNF- α sinergiza con IL-10 e IL-32, frente a la infección con *Leishmania*, se considera que la activación de IL-32 depende directamente de la acción de TNF- α y que la producción de IL-32 podría ser inducido por moléculas microbianas que actúen sobre los receptores TLR-2, TLR-3 y TLR-4 (Dos santos *et al.*, 2018).

Sin embargo, estudios en *L. mexicana* encontraron que la producción de TNF- α en ratones machos infectados es insuficiente para controlar la enfermedad (Satoskar *et al.*, 1995). En el presente estudio, la expresión de mRNA del gen TNF- α detectado a las 24 horas post infección resultó ser menor con respecto a IL-12 y los TLRs, Esto podría deberse a que la detección se produjo muy temprano, otros estudios detectan expresión a más horas de infección, (Bardález *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2013).

VII. CONCLUSIONES

1. El estudio filogenético de las secuencias analizadas de la cepa C234 de *Leishmania* reportadas en el *Genbank* pertenece a la especie *Leishmania braziliensis*.
2. El tamaño de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos peritoneales murinos se relaciona directamente con la cantidad de amastigotes de *Leishmania braziliensis* que presenta el macrófago y la alta capacidad infectiva a las 48 horas post infección.
3. En macrófagos infectados con la cepa C234 de *Leishmania braziliensis* la disminución de producción de óxido nítrico a mayor tiempo de infección está relacionado al incremento de la población de amastigotes y una baja expresión de los genes TLR-4 y TNF- α , por lo tanto, existe una relación directa entre la producción de óxido nítrico y la expresión de mRNA para TLR-4 en macrófagos infectados.
4. La cepa C234 de *Leishmania braziliensis* estimula la expresión de mRNA de los genes TLR3, TLR-4, TLR-9, IL-12 y TNF- α en macrófagos del peritoneo de ratones Balb/c, siendo TLR-3 e IL-12 los de mayor expresión.

5. Existiría una relación entre los niveles de expresión transcripcional de los genes TLR-3 y TLR-9 y las citoquinas IL-12 y TNF- α en macrófagos peritoneales infectados con *Leishmania braziliensis*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Ampliar estudios para la detección de óxido nítrico en otras líneas celulares como células sanguíneas humanas frente a la infección con *Leishmania braziliensis* para poder relacionar mejor los resultados.
- Se recomienda realizar estudios complementarios de expresión de mRNA de los genes: TLR-3, TLR-4, TLR-9, IL-12 y TNF- α en protocolos de mayor tiempo de infección con *Leishmania braziliensis* para ampliar el análisis.
- Realizar el estudio *in vivo* en ratones Balb/c para determinar si existen similitud en la expresión génica de los genes estudiados.
- Complementar los resultados considerando el estudio en otros receptores *Toll* (TLR-1, TLR-2, TLR-7) y de otras citoquinas proinflamatorias (IL-4, IL-8, IL-32) involucrados en la respuesta celular frente a una infección con *Leishmania braziliensis*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A. K. y Lichtman A. H. (2004). Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. 2^{da} Edición. Philadelphia: WB Saunders: 31.
- Abou Fakher F. H., Rachinel N., Klimczak M., Louis J., Doyen N. (2009). TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. J. Immunol; 182:1386 –1396.
- Adachi K., Tsutsui S., Kashiwamura E., Seki H., Nakano O., Takeuchi K. Mice induces liver injury by an IL-12- and Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. J. Immunol; 167: 5928-5934.
- Agudelo S., Robledo S. (2000). Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania sp.*: IATREIA; 13:167-178.
- Alexopoulou, L., Holt A. C., *et al.* (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. Nature; 413: 732- 738.
- Andersen EM, Burans J. (2001). Leishmaniasis research in Lima, Perú. Navy Med; 92: 6-10.
- Antinori S., Calattini S., Piolini R., Longhi E., Bestetti G., Cascio A., *et al.* (2009). Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? Am J Trop Med Hyg; 81:46-51.

- Antoniazzi S., Price H.P., Kropf P., Freudenberg, Galanos C., Smith D. F., y Muller I. (2004). Chemokine gene expression in toll like receptor competent and deficient mice infected with *Leishmania major*. *Infect. Immun*; 72: 5168-5174.
- Audrey Y. Park, Brian Hondowicz, Manfred Kopf, and Phillip Scott. (2002). The Role of IL-12 in Maintaining Resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*; 168: 5771-5777.
- Awasthi A., Mathur R. K. y Saha B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*; 119: 238-58.
- Belkaid Y., Butcher B., Sacks D. I. (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol*; 28: 1389-1400.
- Bennouna S., Sukhumavasi W., y Denkers E. Y. (2006). *Toxoplasma gondii* inhibits Toll-like receptor 4 ligand-induced mobilization of intracellular tumor necrosis factor alpha to the surface of mouse peritoneal neutrophils. *Infect. Immun*; 74: 4274-4281.
- Bofante R. y Borraeta S. (2002). *Leishmania* y leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. *Revista tipografía y litografía horizonte Barquisimeto Venezuela*; 1: 26-38.
- Bryson Alexander, J. (2005). T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*; 99: 17-23.
- Bustin, S. A. (2005). Real-Time PCR. In: *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*; Marcel Dekker. New York; 1131-1135.
- Cáceres A. y Galati E. (2001). Lista de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) para el Perú y especies como posibles vectores naturales e incriminadas en la transmisión de patógenos de la leishmaniasis tegumentaria y la enfermedad de Carrión (verruca peruana). *Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Pública*; 18:100-110.
- Calvay-Sánchez Karen Daphne, Rojas-Palomino Nyshon Máximo, Sandoval-Juarez Aidé Clorinda, Cisneros-Tarmeño Alberto, *et al.*, (2015). Capacidad infectiva de promastigotes en fase estacionaria de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana*, en

línea celular DH82. Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Pública; 32: 33-40. ISSN 1726-4634.1.

- Camargo ME. (2000). Determinación de la producción de óxido nítrico en macrófagos J774.1 activados como respuesta al tamaño de la carga fagocítica de partículas de látex y *Leishmania amazonensis*. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Cameron P., McGachy A., Anderson M., Paul A., Coombs G., Mottram Jc., Alexander J., Plevin R. (2004). Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. J Immunol; 173:3297- 3304.
- Campos, M. A., I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procopio, L. R. Travassos, *et al.*, (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J. Immunol; 167: 416-423.
- Cantanhêde LM, da Silva Júnior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolette R, Salcedo JMV, *et al.* (2015). Further evidence of an association between the presence of *Leishmania* RNA Virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentary Leishmaniasis patients. PLoS Neglected Tropical Diseases; 9(9): e0004079. doi:10.1371/journal.pntd.0004079).
- Cappiello M., Fayyaz S., Trinchieri G., Mosser D., Xiaojing M.A. (2001). Suppression of IL-12 Transcription in Macrophages Following Fcγ Receptor Ligation1. J Immunol; 166: 4498-4506.
- Carrera I., Gazzinelli Rt., Badolato R., Hieny S., Muller W., Kuhn R., Sacks D. (1996). *Leishmania* Promastigotes Selectively Inhibit Interleukin 12 Induction in Bone Marrow-derived Macrophages from Susceptible and Resistant Mice. J Exp Med; 183: 515-526.
- Carrion J., Nieto A., Iborra S., Iniesta V., Soto M., Folgueira C., Abanades D. R., Requena J. M. y Alonso C. (2006). Immunohistological features of visceral leishmaniasis in Balb/c mice. Parasite Immunol; 28: 173-83.

- Carvalho L. P., Pearce E. J. y Scott P. (2008). Functional Dichotomy of Dendritic Cells following Interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF- α , whereas Bystander Dendritic Cells are activated to promote T Cell responses. The Journal of Immunology; 181: 6473-80.
- Carvalho L. P., Petritus P. M., Trochtenberg A.L., Zaph C., Hill D. A., Artis D., Scott P. (2012). Lymph node hypertrophy following *Leishmania major* infection is dependent on TLR-9. J. Immunol; 188:1394-401.
- Centro Nacional de epidemiología, prevención y control de enfermedades, Ministerio de Salud (MINSA, 2018).
www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/SE05/leishmaniasis.pdf
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. MINSA (2018). Semana Epidemiológica Lima: MINSA Vol. 18.
- Chacón Rojas y Marcos Nicolás (2010). Efecto de fagocitosis, la infección por *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* sobre la distribución de filamentos de actina y microtúbulos de macrófagos murinos. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias departamento de Química Bogotá. D.C. tesis para optar al grado de Magister.
- Cortázar Tania M., Hernández Joselín, Echeverry María Clara, Camacho Marcela, (2006). Papel de la vacuola parasitófora de macrófagos de ratón infectados por *Leishmania amazonensis* en la adquisición de moléculas. Biomédica; 26: suppl.1.
- Croft, S. L., and Coombs, G.H. (2003). Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol; 19: 502-508.
- Cruzado-Razco Lizardo, Silva-Correa Carmen, Mantilla-Rodríguez Elena, Escajadillo Bello Hermes. (2013). Aislamiento de *Leishmania sp.* en lesión perianal en una paciente procedente del distrito de Sanagorán provincia Sánchez Carrión. Revista Farmaciencia; 24-27.

- De Souza-Neto SM, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LC. (2007). *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12p40 deficient mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 99: 289-294.
- Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, et al. (2008). A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. J Infect Dis; 198:1565-1572.

□

Descoteaux A., Luo Y., Turco S. J. y Beverley S. M. (1992). A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. Science; 269, 1869-72.

Desjeux P. (1996). Leishmaniosis: Public health aspects and control. Clin Dermatol; 14:417-423.

- Dorak. y K. J. Livak. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature protocols; 3: 1101-1108.
- Dos Santos Jéssica C., Michelle S.M.A. Damen, Leo A.B. Joosten, Fátima Ribeiro-Dias. (2018). Interleukin-32: An endogenous danger signal or master regulator of intracellular pathogen infections-Focus on leishmanioses. Semin Immunol; 38:15-23.
- Duclos S, Desjardins M. (2000). Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. Cell Microbiol; 2: 365-377.
- Englund P.T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. Annu Rev Biochem; 62: 121-138.
- Fan X., Sibalic V., Niederer E., Wüthrich Rp. (1996). The proinflammatory cytokine interleukin-12 occurs as a cell membranebound form on macrophages. Biochem Biophys Res Commun; 225:1063-1070.
- Ferlin W. G., von der Weid T., Cottrez F., Ferrick D. A., Coffman R. L., y Howard M. C. (1998). The induction of a protective response in *Leishmania major*-infected Balb/c mice with anti-CD40 mAb. Eur. J. Immunol; 28: 525-530.
- Flandin J.F., Chano F., Descoteaux A. (2006). RNA interference reveals a role for TLR-2 and TLR-3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. Eur J Immunol; 36: 411–420.

□

□

- Flohe S. B., C. Bauer, Flohe S., y Moll H. (1998). Antigen-pulsed epidermal langerhans cells protect susceptible mice from infection with intracellular parasite *Leishmania major*. Eur. J. Immunol; 28:3800.
- Gatto M., de Abreu M.M., Tasca K.I., Assis Golim M., Da Silva L., Simão J.C., et al. (2015). The Involvement of TLR2 and TLR4 in Cytokine and Nitric Oxide Production in Visceral Leishmaniasis Patients before and after Treatment with Anti-Leishmanial Drugs. PLoS ONE; 01 (2): e0117977.
- Gay N. J. y Keith F. J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. Nature; 351: 355-356.
- Giudice Angela, Camada Ilza, Leopoldo Paulo, Pereira Júlia MB, Riley Lee W. et al., (2007). Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. BMC Infectious Diseases; 7:7.
- Goncalves Agostinho Viana, Magalhães Dias Mourão Luísa, Giunchetti Rodolfo Cordeiro. (2017). Infection of human Monocytes with *Leishmania infantum* strains induces a Down modulated response when compared with infection with *Leishmania braziliensis*. Front Immunol; 8: 1896. Doi: 10.3389/fmmu.2017.01896.
- González Francisco y Serpa Olga (2004). Leishmaniasis cutanea en la infancia. Dermatol Pediatr Lat; 2: 97-108.
- Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol; 3: 23-35.
- Handman E. (2001). Leshmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev; 14: 229-243.
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J. y Williams P. M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Research; 6: 986-994.

□

- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M. *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*; 408: 740-745.
- Heredia Campos Ivett Julieth. (2015). Impacto del volumen del fagosoma en los niveles de mRNA de IL-12 en infección por *Leishmania amazonensis*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia Bogotá, Colombia. Tesis para optar al grado de Magister.

Hernández-Ruiz Joselín y Becker Ingeborg. (2006). Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniosis cutánea. *Salud pública de México*; 48: 5.

Herwaldt B. (1999). Leishmaniosis. *Lancet*; 354: 1191-99.

- Hirotomo K., Abraham G. Cáceres, *et al.* (2010). Use of FTA cards for direct sampling of patients lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*; 48:3661-3665.
- Holzmüller P., Cavaleyra M., Moreaux J., Kovacic R., Vincendeau P., *et al.*, (2005). Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted/secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide mediated amastigote apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol*; 15: 247-57.
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdörfer B., Giese T. y Endres S. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*; 168: 4531-4537. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.010>.
- <https://Es.Scribd.Com/Doc/285311771/Leishmania-Peru>

□

□

- Hu Shanshan, Cameron Marshall, Jocelyn Darby, Wei Wei, *et al.* (2018). Absence of tumor necrosis factor supports alternative activation of macrophages in the liver after infection with *Leishmania major*. *Frontiers in Immunology*. *Front Immunol*; 9: 1. doi: 10.3389/fimmu.2018.00001.
- Ives A., Ronet C., Prevel F., Ruzzante G., Fuertes-Marraco S., Schutz F., *et al.* (2011) *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*; 331: 775-778. Doi: 10.1126/science.1199326.
- Jara M., Berg M., Caljon G., De Muylder G., Cuypers B., Castillo D. Arevalo J. (2017). Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. *PLoS ONE*; 12: e0180532.

□

- Kamhawi S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. Trends Parasitol; 22: 439-445.
- Kaye P. y Scott P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the hostpathogen interface. Nature Review; 10: 604-615.
 - Killick-Kendrick R., Wilkes T.J., Bailly M., Bailly I. y Righton L.A. (1986). Preliminary Field Observations on the Flight Speed of a Phebotomine Sandfly. Trans R Soc Trop Med Hyg; 80: 138-142.
 - Kropf P., Freudenberg M. A., Modolell M., Price H. P., Herath S., *et al.* (2004). Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. Infect. Immun; 72: 1920-1928.
 - Kushawaha P.K.; Gupta R.; Sundar S.; Sahasrabuddhe A. y Dube A. (2011). Elongation Factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN-γ and IL-12 response in cured *Leishmania* infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. The Journal of Immunology; 187: 64176427.
 - Kuzemtseva Liudmila. (2012). Distribución tisular de los receptores Tolllike (TLR) 3, 7 y 9 en el cerdo y efecto in vitro de la infección por el virus de síndrome respiratorio y reproductivo porcino en su regulación en macrófagos alveolares porcinos. Universidad de Barcelona. Departamento de anatomía animal sanitaria. Tesis doctoral.
 - Lage R.S., Oliveira G.C., Busek S.U., Guerra L.L., Giunchetti R.C., Corrêa-Oliveira R., Reis A.B. (2007). Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. Veterinary Immunology and Immunopathology; 115:135-145.
 - Latz E., Visintin A., Espevik T. y Golenbock D.T. (2004). Mechanisms of TLR9 activation. J Endotoxin Res; 10: 406-412.
 - Le, S. T., Tarn C., y Chang K. P. (1993). Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol; 58: 187-203
 - Leishman W.B. (1903). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. BMJ; 1: 1252-1254.

□

Leite P.M., Gomes R.S., Figueiredo A.B., Serafim T.D., Tafuri W.L., de Souza C.C., Moura S.A., Fietto J.L. *et al.*, (2012). Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. PLoS Negl. Trop. Dis. 6:e1850. Doi:10.1371/journal.pntd.0001850.

- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L. y Reichhart J.M. (1996.). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell; 86: 973-983.
- Li Yan, Liu Meifang, Zuo Zengyan, Jing Liu, Xin Yu, Yun Guan, *et al.*, (2017). TLR9 Regulates the NF- κ B–NLRP3–IL-1 β Pathway Negatively in Salmonella-Induced NKG2D-Mediated Intestinal Inflammation. J Immunol.; 199(2): 761-773.
Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601416>.
- Li Y., Ishii K., Hisaeda H., Hamano S., Zhang M., Nakanishi K., Yoshimoto T., Hemmi H., *et al.*, (2004). IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected Balb/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR-9? Gene Ther; 11:941-948.
- Liese J., Schleicher U. y Bogdan C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. Immunobiology; 213:377-87.
- Liew F. Y., Millott S., Parkinson C., *et al.*, (1990). Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. J Immunology; 144(12):4794-4797.
- Livak K. J. y T. D. Schmittgen. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method. Methods; 25:402-408.
- Lubberts, E. (2010). Th17 cytokines and arthritis. Seminars in Immunopathology; 32: 43-53.
- Lucas C., Franke B., Cochay M., Tejada A., Cruz M., Kreutzer R., Barker D., Mc Cann S., Watts D. (1998). Geographic distribution and clinical description of Leishmaniasis cases in Peru. An J Trop Med; 59: 312-317.

- Maksouri Hasnaa, Pham My-Chan Dang, Vasco Rodrigues, *et al.*, (2017). Moroccan strains of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* differentially impact on nitric oxide production by macrophages. *Parasites & Vectors*; 10:506.
- Martínez-Salazar Berenice, Berzunza-Cruz Miriam y Becker Ingebor. (2008). El ADN de *Leishmania mexicana* activa al macrófago murino e induce aumento en la expresión de TLR9. *Gac Méd Méx*; 144 (2): 99104.
- McKerrow J. H., Sun E., Rosenthal P. J., y Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol*; 47: 821-853.
- Meng E. y Lowell C. (1997). Lypopolysaccharide (LPS) induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src- family Kinases Hck, Fgr and Lyn. *Jem*;185: 1661-1670.
- MINSA-Perú. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. (2017); Bolet Epidemiol Semanal 11: Semana Epidemiológica 52
- Montalvo Ana M., Fraga Jorge, Rodríguez Omaira, Blanco Orestes, Alejandro Llanos-Cuentas *et al.*, (2014). Detección de *Leishmania spp.* en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Revista Peruana Medicina Experimental y Salud Pública*; 31: 635-43.
- Moreno, C. y Sanchez-Ibarrola, A. (2003). Receptores tipo toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev Med Univ Navarra*; 47: 29-33.
- Mosser D., y Zhang X. (2010). Activation of Murine Macrophages. *Current Protoc. Immunol.* Cap : 1.
- Mukherjee A., Roy G., Guimond C. y Ouellette M. (2009). The gammaglutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. *Mol Microbiol*; 74: 914–927.
- Muller I., M. Freudenberg P. Kropf A. F. Kiderlen y Galanos C. (1997). *Leishmania major* infection in C57BL/10 mice differing at the LPS locus: a new non-healing phenotype. *Med. Microbiol. Immunol.* 18675-18681.
- Murphy K., Travers P. y Walport M. (2007). *Janeway's Immunobiology*: 7th ed. Garland Science.
- Murray Henry W., Yunhua Zhang Yan Zhang, Vanitha S. Raman, Steven

□

G. (2013). Regulatory Actions of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4

in *Leishmania donovani* Infection in the Liver. *Infect Immun*; 81: 2318–2326.

- Niño A. (2007). Efecto de la fagocitosis, la infección por *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* sobre los niveles de RNA mensajero y proteína de la enzima óxido nítrico sintasa inducible en macrófagos murinos. Universidad Nacional de Colombia. Trabajo de tesis.
- Niño Andrea y Camacho Marcela. (2005). *Leishmania (Viannia) braziliensis* growth *in vitro* culture relies more on folic acid availability than *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 100: 3.
- Nomura N., Miyajima N., Sazuka T., *et al.* (1994). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res*; 1 (1): 27–35.
- Odiwuor S., Veland N., Maes I., Arévalo J., Dujardin J.C., Van der Auwera G. (2012). Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms, and clinical implications. *Infect Genet*; 12: 1994-2002. Doi: 10.1016/j.meegid.2012.03.028.
- Olivier M., Gregory D.J. y Forget G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*; 18:293- 305.
- Olliaro P.L. y Bryceson A. (1993). Practical progress and new drugs for changing patterns of Leishmaniasis. *Parasitol Today*; 9: 323-331.
- Oppenheimer F. R. y Michels P.A. (1993). The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochimie*, 75: 231-234.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). <http://www.stopleishmania.org/es/leishmaniosis-humanos.php>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Control de la leishmaniasis. Informe de la Secretaría 118ª Reunión. Ginebra: OMS; 1-7. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

□

- Ota H., Takashima Y., Matsumoto Y., Hayashi Y. y Matsumoto Y. (2008). Pretreatment of macrophages with the combination of IFN- γ and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. J Vet Med Sci. Jun; 70:589-93.
- Piccolo Johanning, Loretta, Pérez Elizondo, Eugenia, Álvarez Morales, Laura, *et al.*, (2018). Leishmaniasis: Opciones terapéuticas en la población pediátrica. Medicina Legal de Costa Rica; 35:1.
 - Pimenta P. F, Saraiva E.M., Sacks D.L. 1994. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. Exp Parasitol; 72: 191-204.
 - Poltorak A., Smirnova I., Clisch R., y Beutler B (2000). Limits of a deletion spanning TLR4 in C57BL/10ScCr mice. J. Endotoxin Res; 6 (1): 651-656.
 - Popa C.; Netea M.G.; Van Riel P., Van Der Meer J., Stalenhoef, A. (2007). The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. Journal of Lipid Research; 48: 751-762.
 - Prakash Pandey Surya, Doyenb Noelle, Mishraa Gyan C., Bhaskar Saha, *et al.* (2015). TLR9-deficiency reduces TLR1, TLR2 and TLR3 expressions in *Leishmania major*-infected macrophages; Exp Parasitol; 154: 82-86.
 - Quinones M., Ahuja S., Melby P., Pate L., Reddick R., Ahuja S. (2000). Preformed membrane-associated stores of interleukin (IL)-12 are a previously unrecognized source of bioactive IL-12 that is mobilized within minutes of contact with an intracellular parasite. J Exp Med; 192: 507516.
 - Reiner S., Zheng S., Wang Z., Stowring L., Locksley R. (1994). *Leishmania* promastigotes evade Interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ Tcells during Initiation of infection. Journal of Medical and Biological Research; 179: 447-456.

Ribeiro De Jesus A., Almeida R. P., Lessa H., Bacellar O., Caralho E.

□

- (1998). Cytokine profile and pathology in human *Leishmaniasis* *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 31: 143-148.
- Roach D., Bean A., Demangel C., *et al.* (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*; 168:4620–4627.
 - Rojas A. (2013). Estudiar cómo es la síntesis y secreción de IL-12 en macrófagos de la línea celular J774A.1. Universidad Nacional de Colombia. Centro Internacional de Física, Trabajo de tesis.
 - Rojas Chacón Marcos Nicolás. (2010). Efecto de la fagocitosis, la infección por *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* sobre la distribución de filamentos de actina y microtubulos en macrófagos murinos. Universidad Nacional De Colombia. Maestría en Ciencias Bioquímica, Tesis de Grado.
 - Romero G., Arana M., López M., Montoya I, Bohl R., Campos M., Arévalo J., Llanos A. (1987). Characterization of *Leishmania* species from Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 81:14-24.
 - Rossi-Bergmann B., Müller I., Godinho E. (1993). Th1 and Th2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cell in murine leishmaniosis. *Infect Immun*; 61: 266-269.
 - Sacks D., Hieney S. y Sher A. (1984). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol*; 135: 564-569.
 - Salazar M. y Castro E. (2001). Leishmaniosis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el Hospital Regional de Pucallpa de 1997 a 1999. *Dermatol Per*; 11: 21-25.
 - Sandoval Juarez Aidé Clorinda (2016). Asociación entre cuadro clínico y especie de *Leishmania sp*, en pacientes atendidos en el Laboratorio de Leishmaniosis del Instituto Nacional de Salud, 2006 – 2011. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis de grado para optar a Magíster en Salud Pública.

□

- Satoskar y Alexander J. (1995). Sex-determined susceptibility and differential IFN- γ and TNF- α mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana* Department of Immunology, University of Strathclyde, The Todd Centre, Glasgow Immunology; 84: 1-4.
- Schleicher U., Liese J., Knippertz I., Kurzmann C., Hesse A., Heit A., Fischer J., Weiss S., *et al.*, (2007). NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J. Exp. Med.*, 204:893–906.
 - Schleicher U., Liese J., Knippertz I., Kurzmann C., Hesse A., Heit A., *et al.* (2007). NK cell activation in visceral Leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *The Journal of Experimental Medicine*; 204:893-906.
 - Schleicher U., Paduch K., Debus A., Obermeyer S., König T., Kling J., *et al.* (2016). TNF-mediated restriction of arginase 1 expression in myeloid cells triggers type 2 NO synthase activity at the site of infection. *Cell Rep*; 15:1062–1075. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.001.
 - Scott P. (1991). IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*; 260, 496-503.
 - Seigniny C., Li L., Awad A., Huang L, Duffie M., Linden J., Lobo P. y Okusa M. (2007). Activation of Adenosine 2A Receptors Attenuates Allograft Rejection and Alloantigen Recognition. *J. Immunol*;178: 4240-4249.
 - Smith D. P. y Old R. (1993). Structure, Function and Analysis. In: *Molecular Diagnostics* R. Rapley & M.R.Walker, editors. Blackwell Scientific Publication. Victoria, p. 3-25.
 - Stuart K., Brun R., Croft S., Fairlamb A., Gurtler R., McKerrow J., Reed, S. *et al.*, (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118: 1301-1310.
 - Sypek J.P. (1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med*; 177: 1797-1802.

□

- Tamura K.; Ney M. y Kumar, (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceeding of the National Academy Sci*; 101(30): 11030-11035.
- Tauszig S., Jouanguy E., *et al.* (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 97: 10520-10525.
 - Tolouei S., Hejazi S., Ghaedi, Khamesipour, Hasheminia J. (2013). TLR2 and TLR4 in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *Scand J Immunol*; 78: 478-484.
 - Torres Moreno y Erika Paola. (2013). Expresión génica de IL-12, IL-6 y TNF- α en células dendríticas humanas infectadas in vitro con *Leishmania (v.) guyanensis* y tratadas con pentamidina. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina. Tesis de grado para optar a Magister en Genética Humana.
 - Trinchieri G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 3: 133-146.
 - Turco, S. y Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol*; 46: 65-94.
 - Underhill D. (2004). Toll like receptor and microbes take aim at each other. *Curr Opin Immunol*; 16: 483-487.
 - Urbano J., Minaya G., Sánchez-Moreno M., Gutiérrez-Sánchez R. y Marín C. (2011). Molecular characterization and geographical distribution of leishmaniosis aetiological agents in Peru. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol*; 70: 145-156.
 - Vargas-Inchaustegui D. Xin L. y Soong L. (2008). *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J. Immunol*; 180: 7537-7545.
- Ve Thomas, Vajjhala Parimala R, Hedger Andrew, Croll Tristan, Frank DiMaio, Shane Horsefield *et al.*, (2017). Structural basis of TIR-

□

domain assembly formation in MAL- and MyD88-dependent TLR4 signaling.

Nature Structural & Molecular Biology; 24: 743–751.

Von Stebut E. (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. Eur J Dermatol; 17: 115-122.

- Walters L., Irons K., Modi G. y Tesh R. (1993) Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg; 46: 211-228.
- Weinkopff Tiffany, Mariotto Anita, Tacchini-Cottier Fabienne *et al.*, (2013). Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental *Leishmania braziliensis* infection. Infection and immunity; 81: 1575-1584.
- Wilhelm Patricia, Körner Donh Heinrich auser, Röllinghoff Martin y Bogdan Christian. (2001). Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF. J Immunol; 166: 4012-4019.
- World Health Organization. (2013). Leishmaniasis and Leishmaniasis HIV CO-infection. Report on global surveillance of epidemic-prone infections diseases. Jun, 10 <http://www.int/healthtopics/Leishmaniasis.htm>.
- Zhang Y., Luo F., Cui Y., Liu N., Wang L., Xu D., Chu Y. (2011). TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. J. Immunol; 186: 1963-1969.
- Zorrilla Victor, Vásquez Gissella, Espada Liz y Ramírez Pablo. (2017). Vectores de la Leishmaniasis tegumentaria y la enfermedad de Carrión en el Perú: una actualización. Rev Peru Med Exp Salud Pública; 34: 485-96.



X. ANEXOS

ANEXO 1

TABLA 9. Cuantificación de los niveles de óxido nítrico en cultivo de macrófagos murinos no infectados e infectados con *Leishmania braziliensis*.

	Cuantificación de niveles de óxido nítrico					
Tiempo	0H	2H	12H	15H	24H	48H
Macrófagos no infectados	0.019	1.54	1.46	2.60	4.66	13.69
Macrófagos infectados	0.016	2.53	1.02	1.10	1.16	2.37
Valor de <i>p</i>	0.96	0.0004	0.052	0.015	0.0035	0.00012

ANEXO 2

TABLA 10. Análisis comparativo de expresión de mRNA de TLRs y de citoquinas IL-12 y TNF- α y óxido nítrico en cultivo de macrófagos murinos infectados y no infectados con *Leishmania braziliensis*.

	ON	TLR-3	TLR-4	TLR-9	IL-12	TNF- α
Macrófagos no infectados	13.66	0.92	1.87	0.74	0.91	0.92
Macrófagos infectados	2.37	4.65	3.04	5.12	3.23	3.95
Valor de p	0.0001	0.0008	0.00003	0.00005	0.0004	0.00001

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE MEDIO BIFÁSICO PARA CULTIVO DE *LEISHMANIA*

Preparación de agar sangre (Fase sólida)

Se preparó agar sangre de marca LEBCO realizándose una mezcla de 4g de agar con 100 ml de agua destilada llevando el pH 7.4 con CNa, seguidamente se licuó en microondas para luego autoclavar la mezcla, seguidamente se llevó la mezcla a Temperatura de 33°C y se preparó el agar sangre al 10% mezclándose con sangre desfibrinada humana, se distribuyó 3 ml de la mezcla en tubos tapa rosca inclinado a manera de “pico de flauta”. Todo el proceso se realizó en cabina a condiciones estériles.

Preparación de medio acuoso (Fase líquida)

El medio acuoso fue preparado para la fase líquida del agar bifásico, Se disolvió PBS y antibióticos (penicilina sódica 3.000 UI y Sulfato de estreptomycin 3.000 µg) en cantidad de 1 ml y se adicionó a los tubos con agar sangre en fase sólida.

Los tubos con este medio bifásico se conservan en refrigeración a 8°C.

ANEXO 4

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción del RNA se llevó a cabo de los sobrenadantes de los cultivos siguiendo el protocolo de *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Alemania). Se trabajó con los reactivos (AW1, AW2 y los *buffers*) y muestras atemperadas al ambiente.

1. Se preparó el buffer AVL con el *carrier* y se colocó 560 µl en un eppendorf de 1.5 ml, se adicionó 140 µl de sobrenadante de cultivo y se mezcló en vortex por 15".
2. Se incubó por 10 minutos a temperatura del medio.
3. Se les dio un spin a los eppendorfs para concentrar la muestra y se agregó 560 µl de etanol (QP), se mezcló en vórtex.
4. Se aplicó 630 µl de la mezcla a la columna QIAamp, se centrifugó por 3 minutos a 8 000 rpm.
5. La columna QIAamp se colocó en tubo para colección y se procedió a los lavados con el buffer.
6. Se añadió 500 µl del buffer de lavado AW1 y se centrifugar por 3 minutos a 8000 rpm, se transfirió la columna a otro tubo de colección.
7. Se añadió 500 µl de buffer de lavado AW2, y se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos, se descartó el tubo y fue colocado en un nuevo tubo de colección y se volvió a centrifugar por un minuto.
8. Finalmente se traspasó la columna a eppendorf estéril, se adicionó 60 µl de buffer de elución AVE, se esperó un minuto y se centrifugó por 3 minutos a 8 000 rpm, todos los eluidos de RNA de las muestras se conservaron a -80°C. Los eluidos se utilizaron como molde para la amplificación de las regiones secuenciadas.

ANEXO 5

SOLUCIONES PARA CUANTIFICAR NITRITOS POR EL MÉTODO DE GRIESS (GREEU, 1982)

Solución A: En 100 ml de agua bidestilada se disolvió 0.1g de Naftiletíldiamida (N 5889). La mezcla se colocó en frasco color caramelo protegidos de la luz y conservadas a temperatura de refrigeración de 0-4°C.

Solución B: En 100 ml de ácido ortofosfórico al 5% (v/v) se disolvió 1 g de sulfanilamida (S 9251). La mezcla se conservó en condiciones similares que la solución A. para realizar la prueba de Griess se mezcló en partes iguales v/v la solución A y la solución B, Se debe utilizar inmediatamente después de realizada la mezcla. La solución estándar de nitritos se preparó 0.069 g de nitrito de sodio con 100 ml de agua ultra pura. Las soluciones fueron conservadas a temperatura de refrigeración de 0-4°C.